

**Espacenet****Bibliographic data: KR960013703 (B1) — 1996-10-10****LIPOSOME COMPOSITION HAVING BUFFER SOLUTION OF HIGH BUFFER CAPACITY**

Inventor(s): MAYER LAWRENCE [CA]; BALLY MARCEL B [CA]; CULLIS PIETER R [CA]; GINSBERG RICHARD S [US]; MITILENES GEORGE N [CA] ±

Applicant(s): LIPOSOME CO INC [US] ± *A61K31/505; A61K31/65; A61K31/70; A61K33/24; A61K45/08; A61K47/02; A61K47/12; A61K9/127; A61P35/00; B01J13/02; G01N33/544; (IPC1-7): A61K9/127; A61K9/66*

Classification: international: *-* **- European:** A61K9/127; A61K9/127P2

Application number: KR19880071238 19881004

Priority number(s): US19870022154 19870305; WO1988US00646 19880303

Also published as: WO8806442 (A1) NL300036 (I1) LU90717 (A9)
JPH02502458 (A) IL85608 (A) more

Abstract not available for KR960013703 (B1)

Last updated: 5.12.2011 Worldwide Database 5.7.31; 93p

공고특허 제1996-0013703호(1996.10.10.) 1부.

96-013703

(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 특허공보(B1)

(51) Int. Cl.⁶

A61K 9/66

A61K 9/127

(45) 공고일자 1996년 10월 10일

(11) 공고번호 96-013703

(21) 출원번호

특 1988-0701238

(65) 공개번호

특 1989-0700340

(22) 출원일자

1988년 10월 04일

(43) 공개일자

1989년 04월 24일

(86) 국제출원번호

PCT/US 88/000646

(87) 국제공개번호

WO 88/06442

(86) 국제출원일자

1988년 03월 03일

(87) 국제공개일자

1988년 09월 07일

(30) 우선권주장

022, 154 1987년 03월 05일 미국(US)

더 리포조움 캠퍼니, 인코포레이티드 알렌부룸

미합중국, 뉴저지 08540, 프린스턴, 프린스턴 포레스탈 센터, 리씨치 웨이 1

(72) 발명자

매이어 로렌스

캐나다, 브이6엔 2피3 브릿시 콜롬비아, 벤쿠버, 웨스트 35번째 스트리트
4084

밸리 마셀 비

캐나다, 브이6티 1엠8 브릿시 콜롬비아, 벤쿠버, 코르비테 크레센트 5516
풀리스 피터 알

캐나다, 브이6제이 3알2 브릿시 콜롬비아, 벤쿠버, 월니트 스트리트 1829
진스버그 리처드 에스

미합중국, 뉴저지 08821, 요하네스버그, 우편사서함 330호, 알.디.#1

미티네니스 조오지 앤

캐나다, 엔제이 07802, 워싱톤, 패인우드 레인 9

(74) 대리인

강명구

심사관 : 이병현 (책자공보 제4674호)

(54) 원충능이 큰 원충액을 포함하는 리포좀 조성물

요약

내용 없음.

대표도

도 1

영세서

[발명의 명칭]

원충능이 큰 원충액을 포함하는 리포좀 조성물

[도면의 간단한 설명]

제1도는 EPC/콜레스테롤(55:45) 리포좀속에 원격 첨가된 독소루비신 흡수량에 미치는 배양온도의 영향이다. 시트르산 300mM(pH 4.0)에서 리포좀을 만들어 기공크기가 200nm되는 폴리카보네이트 필터속으로 압출시켰다. 독소루비신을 첨가하기전에 수산화나트륨을 사용해서 외부 리포좀용액의 pH를 7.8되게 했다. 21°C(검은사각형), 37°C(흰원형) 및 60°C(검은원형) 각각의 온도에서 평형화한 리포좀(11.0mg 지질/ml)에다 독소루비신(3.0mg/ml)을 첨가했다.

제2도는 시트레이트 300mm를 함유하며 37°C에서 pH 4.0(흰원) 및 pH 7.5(검은원)의 원충액에 대하여 투석 시킨 리포좀 독소루비신(EPC : 콜레스테롤, 55 : 45 mol : mol 29±2/100, 약물/지질 wt./wt)의 방출특성의 그라프.

제3도는 여러 가지 시트레이트의 pH값에서 실시한 혼합실험에서 나타난 시트레이트-독소루비신 상호작용 그라프. 원심분리후 용액중에 잔존하는 독소루비신의 량(mM)을 시트레이트 pH의 함수로 나타내었다. 검은4각형: 60°C에서 혼합한 다음 25°C로 냉각했을 때의 독소루비신 4mM; 흰사각형: 25°C에서 혼합한 독소 루비신 4mM; 검은원: 60°C에서 혼합한 다음 25°C로 냉각했을 때의 독소루비신 20mM; 흰원: 20mM/HEPES, 150mM NaCl

에서 20°C에서 혼합한 대조용의 독소루비신 4mM.

제4도는 pH 7.5(a)와 pH 10.5(b)에서의 독소루비신의 400-70nm사이의 흡광스펙트럼.

제5도는 Triton X-100을 알킬리화한 리포좀성 독소루비신에 첨가하기 전후의 600nm에서의 흡광비에 대한 유리독소루비신/총독소루비신 비율의 비교도. 검은원:능동적으로 흡입된 독소루비신; 원원:수동적으로 흡입된 독소루비신.

제6도는 HSPC/콜레스테롤(원원), DPPC/콜레스테롤(검은사각형), EPC/콜레스테롤(검은원) 등의 각 리포좀계로부터 37°C의 투석 조건하에서 빙크리스틴의 방출을 나타내는 그레프.

제7도는 온도가 5-플루오로우라실(FU)의 흡수에 미치는 영향을 나타내는 그레프. T는 21°C로부터 61°C까지의 온도상승을 나타낸다.

제8도는 외부온총액이 37°C에서의 FU방출에 미치는 영향을 나타내는 그레프.

[발명의 상세한 설명]

본 발명은 약물:지질의 중량비가 큰 리포좀(liposome)함유 항종양제 제조방법 및 그 제제에 관한 것이다.

이러한 제제는 그 효능에 있어서 이들의 유리형태의 동일한 약물과 거의 등등하거나 그 보다 훨씬 크며 그 독성은 일반적으로 작다. 더우기 특이한 방출특성을 가진 이러한 리포좀으로 된 제제의 제법에 관해서는 리포좀 제제에 있어서 독소루비신(doxorubicin)같은 유리형태의 흡입된 항종양제 측정방법과 이율려 기술되고 있다.

특히 본 발명은 독소루비신, 빙크리스틴, 5-플루오로우라실(5-FU), 다우노루비신, 에피루비신, 미토크산트론 및 시클로포스파미드 등과 같은 이온성 항종양제가 있는 약물:지질의 비율이 큰 리포좀의 이용에 관한 것이다.

독소루비신은 스트렙토 마이세스 퓨세티우스 곰팡이에 의해 생기는 안트라시사이클린류의 항생제에 속하는 널리 이용되고 있는 항종양제이다. 독소루비신은 여러가지 종양, 백혈병, 육증(肉腫) 및 유방암에 사용되고 있는데 보편적인 독소루비신의 투여량에서 나타나는 독성중에 포함되는 것으로는 골수성폐지, 틸모증, 점막염 및 위장독선(구역질, 구토, 식욕감퇴 등 포함)이 있다.

가장 심각한 독소루비신 독성은 몸체면적 m^2 당 550mg 이상의 용량을 수용하는 환자의 1-10%에 있어서 울형성 심장병의 원인이 되는 누적용량의 의존성 비가역 심근병(心筋病)이다. 이들 독성은 독소루비신 같은 항종양제를 임상에 사용함에 있어서 극심한 제약을 주고 있다.

리포좀은 험입된 수성상의 체적을 갖는 완전 밀폐된 2중 지질층막이다.

리포좀은 단일층 소포(小泡)(이들은 단일막 2중층을 가진) 또는 다중 소포(복수개의 막 2중층의 특징을 가진 양파구조의 것)이다. 2중층은 소수성의 꼬리부분을 가진 두가지 지질의 단일층과 친수성의 머리부분으로 되어 있다. 막 2중층의 구조는 지질 단일층의 소수성(무극성)의 꼬리부분이 2중층의 중심을 학해 있는 반면 친수성의 머리부분은 수성상(aqueous phase)쪽을 향해 최초의 리포좀 제조(Bangham et al., J.Mol.Biol., 1965, 13:238-252)에 있어서는 유기용매중에 인지질을 용해시킨 다음 증발건조시켜 반응용기에 인지질막을 형성시킨 다음 적당량의 수성상을 가하고 혼합물을 팽윤시켜 얻는 다중구조의 소포(MLVs)로 된 리포좀을 기계적인 수단으로 분산시키는 것이다. 이러한 제조방법에 의하여 Papahadjopoulos등의 방법(Biochim. Biophys. Acta., 1967, 135:624-638)에 의한 음파파쇄된 소형의 단일층상 구조의 소포와 대형의 단일층상 구조의 소포를 제조하게 되는 기초가 되고 있다.

대형 단일층 소포(LUVs) 제조방법 예컨대 역상증발법, 침출법, 세제 회석법 등을 사용하여 리포좀을 제조할 수 있다. 리포좀 제조방법 및 이들에 대한 검토결과는 교재에도 나와 있다(Liposomes, Marc Ostro, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1983, Chapter I; 또한 Szoka, Jr. et al., (1980, Ann. Rev. Biophys. Bioeng., 9:467), LUVs 제조에 특히 바람직한 방법은 Cullis 등의 저서(PCT Publication No. 87/00238, January 16, 1986, entitled Extrusion Technique for Producing Unilamellar Vesicles)에 나와 있다. 이 방법으로 만든 소포를 LUVETS라 하는데 막필터를 통해 가압하여 압출한 것이다. 소포는 200nm필터를 통과시켜 압출해도 만들어진다. 이러한 소포를 VET₂₀₀이라 한다. LUVETS는 최소한 일회의 동해(東解) 사이클에 노출시킨 다음 압출 처리한다. 이 방법에 대해서는 Mayer 등의 논문(Biochim. Biophys. Acta., Trapping Efficiencies Observed in Freeze-Thawed Multilamellar Vesicles)에 나와 있는데 이러한 소포를 FAMLVs라 한다.

소포 제조에 사용되는 기타 방법으로는 역상 증발법 소포(EV:reverse-phase evaporation vesicles 미국특허 제 4,235,871호) 제조방법도 이에 속한다. 기타 사용될 수 있는 부류의 리포좀은 거의 동일한 박층상 용질분포를 가진 것들이다. 이러한 부류의 리포좀은 미국특허 제4,522,803호에서 정의된 바와 같은 정도로 안정한 다중상 소포(SPLVs)가 우세하게 많다. 따라서 미국특허 제4,588,578호에 나온 단상 소포가 여기에 속하고 위에 나온 동해 처리된 다중상 소포(FATMLVs)가 여기에 속한다.

여러가지 스테롤과 이들의 수용성 유도체(예:콜레스테롤, 헤마숙시네이트)를 사용하여 리포좀을 제조하고 있다(Janoff et al., 미국특허 제 4,721,612호 Steroidal Liposomes 참조). Mayhew 등의 저서 (PCT Publication No. WO 85/00968, 1985. 3. 14 발행)에서는 알파토코페롤과 이들의 어떤 유도체로된 리포좀속에 이들을 캔슬화 함으로써 약물의 독성을 줄이는 방법이 나와 있다.

여러가지 토코페롤과 이들의 수용성 유도체를 사용하여 리포좀을 제조한 애도 있다(Janoff et al., PCT Publication No. 87/02219, 1987. 4. 23 발행, Alpha Tocopherol-Based Vesicles 참조).

리포좀-약물 전달계에 있어서 약물같은 생리활성제를 리포좀속에 험입시킨 다음 환자에게 투여하고 있는데 이를 들자면 미국특허 제3,993,754호, 미국특허 제4,415,410호, 미국특허 제4,235,871호, 미국특허 제4,224,179호, 미국특허 제4,522,803호 및 미국특허 제4,588,578호가 있다. 또한 생리활성제가 친유성이면 지질2중층과 회합한다. 본 발명에 있어서 험입이란 말은 수성상의 리포좀에 함유된 약물과 지질 2중층과

결합된 지질모두를 포함하고 있다.

여러가지 연구에서 나타난 바와 같이 항종양제를 사용하는 암치료는 많은 경우에 있어서 유리상태의 제제를 직접 체내에 투여하기 보다는 종래방법을 사용하여 리포좀속에 항종양제를 캡슐화 함으로써 그 효과가 상당히 개선되고 있다(그 에로서는 Forssen 등의 Cancer Res., 43:546(1983); Gabizon 등의 Cancer Res., 42:4734(1982) 등을 참조). 리포좀속에 이러한 제제를 수동적으로 첨가하면 이들의 항종양 활성 정화속도, 조직분포 및 투여에 대한 독성을 변화시킬 수 있다(그 에로서는 Rahman et al., (1982), Cancer Res., 42:1817; Rosa et al., (1982), Transport in Biomembranes:Model Systems and Reconstitution, R. Antoline et al., ed., Raven Press, New York, 243-256; Rosa, et al., (1983), Pharmacology, 26:221; Gabizon et al., (1983), Canaer Res., 43:4730; Forssen et al., 위의 문헌; Gabizon, et al., 위의 문헌; and Olson, et al., (1982), Br. J. Cancer Clin. Oncol., 18:167가 있다). 여러 가지 조성과 크기를 가진 리포좀을 사용함에 따라 나타난 증거들로부터 알 수 있는 것은 독소루비신의 급성 및 만성 독성을 약물을 표적기관으로부터 멀리있게 힘으로써 감소시킬 수 있다는 것이다.

예를 들자면 안트라사이클린 항생물질 다우노루비신과 같은 이들의 약제학적으로 허용되는 유도제와 염의 심장독성을 수동적인 리포좀 캡슐화로 상당히 감소시킬 수 있음이 알려졌다(그 에서는 Forssen et al., 위의 문헌; Olson et al., 위의 문헌; Rahman et al., 위의 문헌을 참조). 이러한 독성의 원인은 심장독성의 김소와 함께 심장속에서의 축적이 김소되면서 주로 나타난다고 보고 있다.(Rahman et al., 1980 Cancer Res., 40:1532; Olson et al., 위의 문헌; Herman et al., 1983, Cancer Res., 43:5427; and Rahman et al., 1985, Cancer Res., 45:796 참조). 이러한 독성은 유리상태의 독소루비신에 대해 정상적으로 제한되는 투여량이다(Minow et al., 1975, Cancer Chemother. Rep. 6:195). 독성이 큰 항종양제를 리포좀속에 결합시키면 투여대상인 환자가 이러한 약물을 노출될 위험은 적어진다.

위에 나온 연구들이 리포좀에 캡슐화한 독소루비신을 사용할 수 있다는 결과를 가지고 있다하더라도 시판되고 있는 리포좀 제제는 확보가 어렵다. 예를 들자면 이들 제제중 대개는 사용되는 지질의 안정성 힘입효율, 경비등과 관련된 여러 가지 문제점으로 인해 애매한 약제학적인 가능성을 가지고 있다. 더우기 약물이 캡슐화되는 효율과 관련된 문제점에 당면하고 있는 것이다. 이러한 문제점들은 이제까지 사용된 수동적인 힘입 방법을 수반하고 있다. 대형 다층소포(MLVs)(Gabizon et al., 1982, 위의 문헌), 대형 단일층 소포(LUVs) 및 소형(음파처리된), 단일층 소포(SUVs)(Gabizon et al., 1983, 위의 문헌, Shinozawa et al., 1981, Acta, Med. Okayama, 35:395) 등을 포스파디딜콜린(PC) 및 콜레스테롤외에도 양으로 하전되고 음으로 하전된 지질의 여러 가지 양을 부가한 지질 조성물과 더불어 사용되고 있다. 지질 조성의 변화는 양성 또는 중성의 지질만을 험유한 계가 힘입 효율이 적고 지질 대 약물의 비율이 작게 됨에 따라 독소루비신 힘입조건에 따라 크게 좌우된다(Gabizon et al., 1983 위의 문헌; Shinozawa et al., 위의 문헌).

카르디오리핀 같은 음으로 하전된 지질을 험유하는 리포좀에 있어서 음으로 하전된 지질과 양으로 하전된 독소루비신과의 희합으로 인하여 약물 대 지질의 비율이 커진다.

그러나 제조된 제제는 일관성이 없어서 소포의 크기와 표면충전에 변화를 나타낸다. 또한 필요로 하는 지질의 종류와 양은 경비를 고려하면 금기적인 것이다. 그러나 종래의 항종양제를 험유하는 리포좀에서 나타나는 기타 문제점은 이제까지의 독소루비신을 험유하는 리포좀 제제는 근본적인 안정성을 완전히 충족시키지 못하고 있다는 것이다.

리포좀 제제내에서의 독소루비신의 보유량은 수시간내에 보편적으로 측정되지만 약제학적인 적용에 있어서는 보편적으로 일년이상의 안정성을 필요로 한다. 더우기 지질성분의 화학적인 안정성은 카르디오리핀 같은 극히 불포화된 지질이 양이 크므로 인하여 의문시 된다. 기타 문제점으로는 음으로 하전된 지질과 스케일업 할때의 경비가 만히 소요된다는 점이다.

독소루비신이 양극성을 가지고 있다는 사실로 인해 2종총액에 대해 투과성이 있어서 소포로부터 약물을 누설하기 때문에 리포좀 제제를 불안정하게 한다(Gabizon et al., 1982, 위의 문헌; Rahman et al., 1985, 위의 문헌; Ganapathi et al., 1984, Biochem. Pharmacol., 33:698).

위에 나온 이제까지의 연구에 있어서는 지질을 사용해서 제제중의 지질함량을 증가함으로써 힘입된 약물의 독성을 개선하여 약물의 독성을 완충시켰다. 본 출원인들은 실제로 저지질성분(약물 대 지질의 중량비가 큰 것)이 독성을 가장 효과적으로 감소시키고 있음을 확인한 것이다. 이런 관계는 수동적인 힘입방법을 이용하여 힘입시키는 독소루비신의 양에 제한이 있기 때문에 동일량이 약물을 힘입시키는데 필요한 지질의 양을 증가시키는 이유로 해서 밝혀지지 않고 있었다.

Mayer 등에 의하면 항종양제의 효과적인 리포좀 힘입과 관련된 문제점들은 막통과 이온 기울기를 사용하여 해결할 수 있다(PCT 출원 86/01102 참조, 1986. 2. 27 공고). 독소루비신 흡수를 유발하는 것과는 달리 이러한 막통과 기울기는 리포좀에서의 약물 보유량을 증가시키는 역할을 한다. 본 발명은 막통과 이온, 특히 막통과 pH 기울기를 사용해서 힘입된 약제를 유지시키는 리포좀을 효과적으로 첨가할 목적으로 사용된 개선된 원충 조성물에 관한 것이다.

리포좀 자체는 정액으로 투여되는 한 이제까지 인간의 임상실험에서 아무런 심각한 독성이 없다고 보고 되어 있다(Richardson et al., (1979), Br. J. Cancer 40:35; Ryman et al., (1983) in Targeting of Drugs G. Gregoriadis, et al., eds. pp 235-248, Plenum, N.Y.; gregoriadis G.m (1981), Lancet 2:241; Lopez-Berestein et al., (1985) J. Infect. Dis., 151:704). 간장, 비장, 골수등과 같이 모세관으로 되어 있으며 이들 기관에 존재하는 식균세포에 의해 식균작용을 받은 망내개기관에 리포좀이 집중적으로 모인다고 보고되어 있다.

리포좀은 항종양제 투여시에 사용함으로써 약물의 캡슐화와 힘입효율 및 치료도중의 약물 빙출등에 있어서 여러 가지 문제점이 일어난다. 캡슐화에 있어서 힘입효율을 크게 하여 치료시에 환자에게 부여되는 지질 부가량을 극소화해야 하는 필요성이 계속 있어 왔다. 더우기 힘입효율이 크다는 것은 캡슐화 공정도중 소량의 약물이 성실된다 것을 뜻하는데 이것은 암치료시에 사용되는 고가의 약을 취급할 때 한가지 중요한 사항이다. 약물 빙출에 있어서 독소루비신 같은 많은 항종양제는 캡슐화후에 종래의 리포좀으로부터 신속하게 빙출된다는 것이 확인되고 있다. 이렇게 신속히 빙출되면 리포좀 캡슐화의 효과를 감소시키게 되고 순환계

속으로 약물의 방출을 가속화 하므로서 독성이 나타나게 되는데 따라서 이러한 현상은 바람직한 것이 되지 못한다.

따라서 리포좀으로부터 항조양제와 기타 약물의 방출속도를 감소시킬 수 있는 방법을 찾아내고자 계속 노력 해온 터이다.

캡슐화와 방출에서 제기되는 문제점외에도 항종양제를 함유한 리포좀을 의사들에게 공급할 수 있는 상업적으로 허용되는 길을 찾아내고자 하는 문제가 중첩되어 있기도 하다.

리포좀을 제조하여 필요한 만큼 첨가하는 것은 실험실적인 면에서 허용될 수 있는 방법이겠으나, 임상적인 면에서는 일반적으로 만족스럽지 못하다.

따라서 캡슐화된 약물이 있던지 없던지 간에 리포좀을 손상이 없이 종래의 판로를 통해 선적하고, 저장하고 수송할 수 있는 방법이 필요한 것이다.

본 발명에서는 막투과 pH 기울기를 이용하는 캡슐화법이 나오는데 이것은 효과의 적정화와 약제학적인 문제점 및 약물의 독성을 감소시키는 약물 대 지질의 중량비에 따른 제제와 관련된 요구를 충족시켜 주고 있다.

제조된 리포좀-항종양제 제제는 부가공정은 특수한 지질의 조성, 리포좀의 크기 또는 부하량에 한정되는 것이 아니라는 점에서 극히 유통성이 있다. 저렴한 지질을 사용하고 광범위한 지질조성에 대한 100%정도의 힘입효율과 소포크기를 쉽사리 얻을 수 있고 약물 대 지질의 중량비가 약 0.1-약3.0:1이상이어서 종전의 제제의 경우보다 많고(따라서 지질양은 감소됨) 스케일업이 간소화된다.

pH 작동에 의한 흡수법의 다른 특이한 장점은 수동적으로 험입된 약제가 있는 리포좀에 비해 본 발명의 리포좀으로부터 약물이 방출되는 속도가 느리다는 것이다. 험입된 생리활성제의 방출속도가 느린 것은 제제에 사용된 완충계에 이해 중재되기 때문이다. 따라서 방출의제성 완충액 또는 완충계에 의해 약제를 리포좀 속에 유지시킨다.

본 발명의 다른 특징은 리포좀 제제중의 유리상태 및 리포좀이 관련된 항종양제(예:독소루비신, 다우노루비신, 에피루비신)를 측정하는 검정법이다. 이들 약물들은 독성이 크기 때문에 제제중의 유리상태 약물의 힘입률을 정량하는 것이 바람직하다. 예를 들자면 이 방법에 따라 리포좀에 존재하는 총약물의 약 55%이하에서부터 약 95%까지의 유리상태 약물을 검출할 수 있다. 이 검정법에서는 표준 실험실이나 임상실무에 공통적이 아닌 재료나 장치를 사용할 필요는 없다.

본 발명은 EPC와 콜레스테롤 같은 지질, 특히 포스포리피드와 항종양제로 되어 있으며, 리포좀에는 막투과 이은 기울기, 바람직하게는 pH 기울기가 있는 리포좀 조성물에 관한 것이다.

이 리포좀의 약물(항종양제) 대 지질의 비율이 약 0.1:1-약 3:1, 바람직하게는 약 0.3:1-3:1이다.

리포좀에는 시트르산/탄산나트륨, 시트르산/비스인산나트륨 또는 탄산나트륨/황산 칼륨-HEPES 같은 방출억제 완충조합물이 있다. 항종양제의 예로서는 안트라사이클린(예:독소루비신, 다우노루비신, 에피루비신, 빙가일카로이드(빈블리틴, 빙크리스틴), 푸린 또는 피리미딘 유도체(예:5-플루오로우라실), 알킬화제(예:미토크산트론, 메클로르에타민 염산염, 시클로포스파미드) 또는 항종양성 항생제(예:미토마이신, 블레오마이신) 등이 있다. 리포좀은 인지질(예:난포스파티딜콜린(EPC:eggphosphatidylcholine), 수소화대두포스파티딜콜린, 디스테아로일포스파티딜콜린, 디미리스토일포스파티딜콜린, 디스테아로일포스파티딜콜린 또는 디아라키도노일포스파티딜콜린)로 되어 있으며, 추가로 콜레스테롤이 인지질:콜레스테롤=55:45의 몰비로 존재한다.

리포좀에는 추가로 알파토코페롤이 있다. 리포좀의 크기는 약 30nm-약 2마이크론인데 바람직하게는 직경이 약 100-약 300nm인 것, 대형 단일층 소포이다. 이들 중에는 지질이 약 50-200mg/ml 보다 바람직하게는 약 90-약100mg/ml 함유되어 있다. 리포좀중의 항종양제의 험입량은 약 59%-약 100%, 바람직하게는 약 90%-약 110%, 보다 바람직하게는 약 98-약 100%이다. 이들 리포좀은 대형 단일층 소포이고 크기분포에 있어서는 균질하거나 단일 형태이다. 리포좀은 환자의 점액내로 투여된다. 리포좀속에 험입시 항종양제와 약제학적으로 허용되는 부형제 또는 담체를 함유하는 약제학적 제제는 본 발명의 또 다른 실시태양이다.

본 발명의 리포좀 조성물을 사용하여 종양성 질환을 치료 또는 안정시키거나 종양성 질환의 발단 또는 재현을 예방한다. 본 발명의 조성물을 예컨대 3성분계로 제공한다. 항종양제가 독소루비신인 경우에는 3성분계는 pH가 약 4.0인 산성용액, 염기성 용액 및 항종양제중에서의 리포좀으로 구성된다.

산성용액은 아세트산 완충액, 옥살신 완충액 또는 숙신신 완충액, 바람직하게는 수성 시트르산 완충액이다. 염기성 용액은 탄산나트륨으로 바람직하다. 약물 대 지질의 중량비는 약 0.1:1-약 3:1이다.

리포좀 조성물은 먼저 1차 수성매체, 바람직하게는 완충액중에서 리포좀을 만든 다음 매체를 산성화하거나 알칼리화하여 pH 기울기를 형성함으로써 제조된다. 생성된 산성 또는 알칼리성 리포좀을 독소루비신 같은 항종양제와 본 발명의 리포좀을 막투와 pH 기울기 설정 전후에 털수시킨다. 리포좀은 대형 단일층 소포일 수 있고 사슬이 긴 포화지질로 구성될 수 있다. 본 발명의 다른 특징에 있어서 리포좀 제제중에 있는 유리 항종양제를 측정하는 방법이 나와 있다. 예로서 독소루비신의 경우 이 방법에는 제제중의 리포좀을 알칼리화하고 가용화하기 전후의 흡광도 차이, 바람직하게는 약 600nm를 측정하는 것이 포함된다. 특히 독소루비신을 함유하는 리포좀의 흡광도는 약 600nm이다. 리포좀 제제를 알칼리화해서 다시 600nm에서 흡광도를 측정한 다음 리포좀을 용해하고 다시 600nm에서 흡광도를 측정한다. 알칼리화된 리포좀을 칼라 차트와 비교하여 이 칼라차트로부터 캡슐화된 약제의 백분율을 측정한다. 본 발명은 종래의 리포좀에 보이는 리포좀에 대한 항종양제의 효과적인 험입률 입증하는 것이다. 또한 여기에 개시된 제제의 리포좀은 약물 방출속도를 느리게 한다. 본 발명은 항종양제인 독소루비신, 빙크리스틴, 5-플루오로우라실 같은 약물을 험입하는 약물 담체계로 사용하기 위한 리포좀 제제에 관한 것이다. 이들개를 사용하여 항종양제의 독성을 감소시킨다.

앞서 나온 바와 같이 본 발명의 리포좀은 공지방법으로 만들 수 있으나 바람직 하게는 Bally등의 방법

(PCT 출원 제 86/01102, 1986. 2. 27 공고)에 따라 만든다. 이 방법에서는 이온화성 항종양제를 리포좀에 가하여 중성 pH 및/또는 수동적인 함입법으로 얻게 되는 것 이상의 농도를 가진 수용액에서의 약물의 용해도 보다 상당히 큰 내부농도를 얻을 수 있다. 이 방법에 있어서 리포좀막을 통해 막투과 이온의 (pH) 기울기가 생성되고 pH 기울기를 이용하여 리포좀속으로 항종양제를 부가한다.

막투과 pH 기울기는 리포좀막을 통해 헌가지 이상의 하전된 화학증(예:Na, Cl⁻, K⁺, Li⁺, OH⁻) 바람직하게는 H⁺)에 대한 농도기울기를 생성시킴으로써 얻게 된다. 이들 이온 기울기는 막을 통해 이온화성 생리활성제(약물)의 흡수를 조장한다. 본 발명에 있어서 H⁺(pH) 기울기를 사용하는 것이 바람직하다.

대표적으로 사용될 지질로 된 건조된 필름을 수용액을 써서 수화시킨다. 이 수화는 종류수(예:USP 주사용물)이나 수성완충액 같은 1차 수성매체를 사용한다. 예컨데 양이온성 약물을 부가하게 될 경우 이러한 수성 완충액으로는 제한된 것은 아니라 비교적 산성완충액을 포함한다. 이러한 완충액으로는 시트르산, 숙신산, 아세트산 또는 옥살산완충액이 있다. 이러한 완충액은 pH 약 3.5~약 4.5에서 가장 잘 사용된다. 독소비루신, 다우노루비신, 에피루비신 및 빙크리스틴 같은 약물을 부가할 경우에는 초기 수화매체로 약 pH 4.0정도의 시트르산 300mM를 사용하면 리포좀의 내부가 산성으로 된다. 시트르산은 이들 약물을 리포좀속으로 가장 잘 흡수하게 하는 완충액으로 알려져 있다. 기타 완충처리된 염수도 pH를 약 4.0으로 조절하면 이 혼합물중에 포함될 수 있다. 완충처리된 염수에 속하는 것으로는 인산염 완충 염수(PBS), 트리스-(히드록시메틸)-아미노메테인 염산염(tris) 완충액, N-2- 히드록시에틸 피페라진-N3-2-에탄솔폰신(HEPES), 글리신 완충액 또는 글루탐산등의 pH가 비교적 산성으로 조절된 것들이 있다.

마찬가지로 음이온 항종양제를 염기성 내부를 가진 리포좀속에 부가한다. 이러한 부가는 최초의 매체를 산성이 큰 매체로 교환함으로써 나타나는 염기성 1개 기울기에 응답하여 취해주는 것이다. 예컨데 5-플루오로우사실을 부가할 경우에 있어서 1차 매체는 비교적 염기성, 예컨데 매개 약 6.8-11.0, 바람직하게는 약 9.6인 완충액인 것이 좋다. 이를 들자면 탄산나트륨 300mM를 pH 9.6정도에서 사용한다. 기타 염기성 수용액, 예로서 수산화나트륨이나 비스인산나트륨 같은 수용액도 사용된다. 1차 수성 매체를 캡슐화하는 리포좀은 한가지 이상의 하전된 화학증의 1차 농도를 가진다. 이들 리포좀은 MLVs를 잘 생성하는 방법에 따라 제조하며 직경이 약 400nm 이상이 된다.

이 리포좀을 위에 나온 Cullis등의 LUVET 법에 따라 필터속을 통해 압출한다. 이 방법에 있어서 리포좀을 가입하여 한가지 이상의 폴리카보네이트 필터속으로 통과시킨다. 리포좀을 필터속으로 1회 또는 수회통과 시킴으로써 압출하여 균일한 크기의 리포좀으로 만든다.

리포좀이 적당한 크기로되면 외부매체를 바꾸어 주는데 즉 최초의 외부매체를 한가지 이상의 하전된 화학증(예:H⁺이온)의 상이한 농도를 가진 새로운 외부매체, 예컨데 비교적 염기성이거나 산성인 매체로 바꾸어 준다. 외부 매체를 교체할 때는 예컨데 독소루비신, 다우노루비신, 또는 에피루비신인 경우에는 외부 매체를 바꾸어 주고, 탄산나트륨 같은 매개 pH 11.0정도의 염기성 용액을 가하여 최종 pH가 약 7.5-8.3 가장 바람직하게는 7.8이 되게 함으로써 가능하다.

빙크리스틴의 경우에 있어서 약 pH6.8-7.2 정도 바람직하게는 7.0-7.1인 정도의 비스인산나트륨을 사용한다. 기타 사용가능한 염기성 용액으로는 탄산수소나트륨, 비스인산나트륨, 수산화나트륨 또는 인산칼륨이 있다. 이러한 방법에서 농도 기울기가 나타난다. 5-플루오로우리실의 경우에 있어서 외부매체를 pH6.5-8.5 정도의 황산나트륨/150mM HEPES 또는 황산으로 비교적 산성인 매체로 변화시켜 주어 pH가 약 7.00이 되게 한다. FU에 대해 사용할 수 있는 기타 비교적 산성인 용액으로는 HCl, H₃PO₄ 등이 있다. 외부매체를 변화시키는데 사용되는 기타 방법은 겔여과법(예:새로운 매체로 평평화된 Sephadex 칼럼을 사용), 원심분리법, 투석법 또는 관련된 기술이 있다. 막투과 pH 기울기는 약물을 리포좀속으로 부가함으로써 유리 상태의 소포와 관련된 약물의 비율[H⁺]_{in}/[H⁺]_{out}의 비율이상이다. 이온 기울기는 부가가 끝난 뒤에도 리포좀막 전체에 걸쳐 잔존한다.

단일 항종양제를 부가하는 외에도 pH 기울기 부가법을 사용하여 동시 또는 순차로 복수개의 항종양제를 부가할 수 있다. 또한 이온화성 항종양제 부가되는 리포좀 자체를 종래의 수동 캡슐회법(예:리포좀이 만들어지는 완충액속에 약물을 가함)을 사용하여 기타 항종양제나 기타 약물로 사전 부가시켜 둘 수 있다. 종래의 부가되는 물질은 이온화성일 필요는 없기 때문에 이러한 접근법에 의하여 암치료용의 리포좀으로 캡슐화된 약물작태일을 제조함에 있어 큰 유통성을 발휘하게 된다. 이들 약물작태일은 두가지 이상의 리포점(이것은 동일하거나 상이한 항종양제를 함입함)으로 되어 있기도 하고 상이한 지질제제로 되어 있기도 하며 상이한 소포크기로 되어 있기도 하다. 이러한 작태일을 투여하여 치료효능, 안정성, 약물의 지속방출 또는 표적치료등의 효과를 볼 수 있다.

막 투과 기울기-약물방출

리포좀으로부터의 이온화성 항종양제나 기타 이온화성 생체활성제의 방출속도를 감소시키는 것과 관련된 본 발명의 특징을 살펴보건데 놀라운 사실인 것은 막투과 pH 기울기가 리포좀막을 통한 방출속도를 현저하게 감소시킬 수도 있다는 점이다. 이러한 약물의 방출속도가 감소되는 것은 리포좀 내부의 완충능력에 기인하고 있다. 즉 H⁺이온과 같은 하전된 화학증으로된 리포좀의 내외부의 농도차(즉 pH기울기)에 기인하고 있는 것이다. 예를 들자면 pH 기울기를 감소시키기 위해서는 다양한 양이온(예:항종양제)의 유입을 필요로 하는 내부 완충 능력이 큰 것은 체류시간이 훨씬 길어진다. 더우기 내부 완충능력이 다 소진되고나면 항종양제(예:독소루비신)의 방출속도는 증가된다. 리포좀에 약물을 부가할 때는 리포좀의 외부매체의 이온농도를 조절함으로써 리포좀막에 대한 회학전위를 형성할 수 있게 해야 할 필요가 있다. 이온이 수소양이온인 경우에는 이러한 조절은 비교적 산성이거나 염기성이 pH의 용액을 참가해서 pH를 바꿔주면 되는 것이다.

앞서 나온 바와 같이 생체활성제의 방출속도는 완충액에 의해 중개된다. 어떤 완충액 조합물(내부 수성매체/외부수성매체)은 리포좀 내용물의 방출을 촉진하기도 하고 감소시키기도 한다.

예를 들자면, 독소루비신, 에피루비신 및 다우노루비신등과 같은 약물의 경우에 있어서 리포좀 내용물의

유지에 가장 적합한 것으로 확인된 완충액 조합물은 시트르산/탄산나트륨이다. 빙크리스틴의 경우에 있어서 가장 적합한 완충액 조합물은 시트르산/비스인산나트륨이다. 5-FU의 경우에 있어서 바람직한 완충액 조합물은 탄산나트륨/수산화나트륨 또는 탄산나트륨/황산칼륨-HEPES이다.

pH 기울기를 나타내 보이는 EPC/콜레스테롤(55:45) 소포에 있어서의 독소루비신 유지률은 시트르산염/탄산염 완충액을 사용하면 증가하는데 약물 방출량이 약 5%이하인 현성이 37°C에서 24시간이상 지속되었다. 이러한 소포에 함입된 독소루비신도 항정성분에 대해서는 안정하다. 즉, 독소루비신이 5%이하인 것은 95%의 신선한 인간혈청속에서 37%에서 항온처리한 소포에 대해 24시간이상에 걸쳐 방출된다. 화합검정법에 있어서 pH 7.5에서 HEPES로 독소루비신을 배양하고 시트레이트 완충액(시트르산 나트륨)을 4.0-7.5정도의 pH 범위에 있게할때 시트르산염은 독소루비신과 반응하여 침전하는데 반하여 HEPES 완충액은 그렇지 않다. 이러한 완충액 조합물, 즉 시트르산염/탄산염은 리포좀으로부터 약물의 방출속도를 감소시키는 작용을 한다. 기타 방출속도를 저하시키는 완충액 조합물 또는 육산/인산칼륨 또는 숙신산/탄산수고나트륨이 있는데 시트르산/탄산나트륨 또는 시트르산/비스인산나트륨이 바람직한 것이다.

리포좀을 항온처리하여 캡슐화가 잘되게(37°C 정도 이상에서 바람직하게는 독소루비신이나 FU의 경우에서는 약 60°C 정도에서)하는데 항온처리 시간은 온도에 따라 달라진다. 독소루비신, 아피루비신 및 미토크산트론을 25°C에서 항온처리한다. 이온화성 항종양제도 동일한 온도에서 가열하며 두가지 성분을 혼합한다. 다시 리포좀-약물 혼탁액을 항온처리하는데 여기서 얻은 용액의 최종 pH가 약 6.9-8.3 바람직하게는 약 0.75-7.8 정도이다. 콜레스테롤을 함유한 리포좀속으로 독소루비신을 효과적으로 함입시키자면 상승된 온도에서 항온처리하는 것이 바람직하다. 이 용액을 필요에 따라 생리식염수 같은 것으로 희석해서 투여한다.

기타 방법들은 약물, 완충액 및 리포좀을 혼합하는데 적당하다. 이를 들자면 먼저 염수를 사용해서 약물을 혼탁시킨 다음 막투과 pH기울기를 가진 리포좀에다 첨가한다. 더우기 pH를 조절함과 동시에 리포좀에다 약물을 가하면 기울기가 생기게 된다. 기타 혼합방법은 항종양제와 기타 약제학적인 성분에 따라 필요하게 된다. 적당한 속성매체(예:프로토회활 수 있는 아미노기를 포함하는 유기화합물)중에 용해하였을 경우 이온화 상태로 존재하는 항종양제와 더불어 막투과 pH기울기 부가법을 사용한다. 이들 약제에는 1차, 2차, 3차 또는 4차 아민그룹과 친유성 그룹이 있으며 pH기울기를 분산시키지 않아야 한다. 이들 약제는 비교적 친유성이어야 리포좀의 속으로 분배되어 들어가게 된다. 이런 방법으로 리포좀속으로 부가되고 본 발명에서 사용가능한 항종양제의 몇가지 예로서는 안트라사이클린(예:독소루비신, 다우노루비신, 미토크산트론, 아피루비신), 빙카 일카로이드(예:빈블라스틴, 빙크리스틴), 알킬화제(예:시클로포스파미드, 메클로르에타민염산염), 푸린 및 피리미딘 유도체(예:5-플루오로우리실 등이 있다(Goodman and Gilman, eds., The Pharmacological Basis of Therapeutics, 6th ed., MacMillan Co., 1980, pages 1249-1314). 본 발명은 현재 확보 가능한 약물에 한정되는 것이 아니고 아직까지 개발되니 않았거나 시판되고 있지 않은 것들에까지 확장되며 막투과 pH기울기를 이용하여 부가되는 것들이 포함된다.

이온화성 항종양제가 막투과 pH기울기에 응답하여 리포좀속으로 부가해 들어가는지를 측정하기 위해 ^3H -DPPC 트레이서와 비교적 산성 또는 염기성인 외부 매체(예: pH 4.0정도의 시트르산 300mM)를 사용하여 EPC/항유리포좀을 제조한다(EPC 약 1.0mM). 이들 리포좀을 LUVET법에 따라 두개의 100mM 필터속으로 10회정도 압출시킨 다음 외부 pH를 비교적 산성 또는 염기성 pH, 어번데 약 pH 11.0정도로 조절한다. pH기울기가 형성되면 방사성 동위원소로 표지한 약제를(사용된 지질 1.0mM당) 약 200uM의 리포좀과 혼합한다. 650-M Sephadex 미니칼럼에서 500 X g에서 유리상태의 함입되지 아니한 약제로부터 리포좀을 분리하여 100mM 튜우브 13개에 받아넓고 섬광계 수기에서 방사능을 측정한다. 지질 μmole 당 약물의 흡수량(nmol)을 항온처리시간에 대하여 플로트한다. 독소루비신 100%를 이들 조건하에서 리포좀 속에 취하게 된다.

독소루비신의 경우세 있어서 시판되고 있는 각각의 형태의 것들, 즉 분말, 고체 및 메틸파라벤함유형(Adriamycin R.D.F., Adria Laboratories, Inc., Columbus, Ohio)을 본 발명에서 사용한다. 메틸파라벤 함유형을 사용할 경우 염수같은 수용액을 이 험에다 첨가해서 녹인다음 이 혼탁액과 2중층에 대해 막투과 pH 기울기를 가진 리포좀을 혼합한다. 60°C에서 약 10분간 혼합하면 독소루비신 약 98%이상이 캡슐화된다.

본 발명의 리포좀 제제에 사용되는 지질로는 포스파티딜콜린(PC), 포스티아데탄올아민(PE), 포스티아데세린(PS), 포스파티딜글리세롤(PG), 포스파티드산(PA), 포스파티딜이노시톨(PI), 스피고미엘린(SPM)등과 같은 인지질 단독 또는 조합물이 있다. 인지질은 합성된 것이던지 천연산(예:계란, 대두)같은 것이라도 된다. 디미리스토일포스파티질콜린(DMPC)와 디미리스토일포스파티딜글리세롤(DMPG)같은 인지질로 사용된다. 바람직한 실시태양에 있어서는 난 포스티아데탈콜린(EPC:eggphosphatidylcholine)과 콜레스테롤을 55:45의 물비로 사용하는 것이 좋다. 또다른 실시태양에 있어서는 디스테아로일포스파티딜콜린(DSPC), 디팔미토일포스파티딜콜린(DPPC) 또는 수소첨가된 대우 포스파티딜콜린(HSPC)를 폴레스테롤과 함께 55:45의 물비로 사용한다. 디미리스토일포스파티딜콜린(DMPC)과 디아라키도노일포스파티딜콜린(DAPC)도 마찬가지로 사용된다. 각 지질들의 전이온도(T_c)가 높기 때문에 (예:DSPC의 T_c 약 65°C, DPPC의 T_c 약 45°C, DAPC의 T_c 약 85°C), 이러한 지질을 그들의 T_c 까지 온도로 가열하던지 T_c 보다 약간 높은 온도(예: 약 5°C 높개)까지 가열하여 리포좀을 만든다.

리포좀에는 기타 스테로이드성분(예:콜레스테롤의 폴리에틸렌글리콜)PEG-콜레스테롤, 코프로스탈올, 콜레스탄올, 또는 콜레스탄 또는 알파-토코페롤)을 함유할 수도 있다. 이들 중에는 또한 스테로이드의 유기산 유도체(예:콜레스테롤 헤미숙시네이트(CHS))를 함유할 수도 있다. 토코페롤의 유기산 유도체를 알파-토코페롤 헤미숙시네이트(THS)같은 리포좀 형성 첨가성분으로 사용해도 좋다. CHS-와 THS-를 함유하는 리포좀과 이들의 트리스염 형태는 모두 이들 스테로이드를 협용하는 리포좀 제제에 대한 공지방법으로 제조하는 것이 일반적이다. [특히 Janoff등의 방법(미국특허 제4,721,612호, 1988.1.26. Steroidal Liposomes, 및 PCT Publication No. 87/02219, published April 23, 1987, Alpha Tocopherol-Based Vesicles, 참조].

리포좀에는 당지질을 함유할 수도 있다. 본 발명에 있어서 사용되는 지질의 농도는 바람직하게는 50mg/ml-약 200mg/ml, 더욱 바람직하게는 약 90mg/ml-약 110mg/ml이나 임계 미셀농도로 알려진 약40%(중량)정도의 지질농도를 함유해도 된다. 본 발명에서 사용되는 약물 대 지질의 중량비는 약 3:1정도로 크다. 막투과 pH 기울기에 의해 부가되는 이들 약물, 특히 독소루비신의 경우에 있어서 이들의 범위는 약 0.1:-약 3:1이 바람직하고 가장 바람직한 것은 약 0.3:1이다. 이 비는 지질제제와 소포의 크기에 따라 변한다. 빙크리스틴

의 경우 약물:지질의 중량비는 약 0.01:1~1:1이고, 바람직한 것은 약 0.1:1~약 0.29:1이다.

독소루비신-함입효율의 약물 대 지질비의 의존성

시트레이트 300mM을 함유하는 (pH4.0) 약물 대 지질(wt/wt)비기 약 1:10~약1:3사이에서 변하는 것은 독소루비신의 함입효율에 아무런 영향을 주지 않는다. 이 범위에서는 약 100%의 함입이 이루어지고 이러한 약물 대 지질의 비에서 24시간에 걸쳐 약물의 약 5%이하가 방출된다. 그러나 약물 대 지질의 초기의 비가 약 1:20이상으로 증가하면 함입효율이 상당히 감소하고 이를 소포는 독소루비신 방출의 증가현상을 나타낸다. 본 발명의 바람직한 범위내에서 소포의 크기, 약물 대 지질의 비에 따라 함입효율은 그다지 영향을 받지 않거나 함입효율이 약 100% 지질조성물은 크기범위가 약 100nm~1.4nm인 소포와 약물 대 지질의 비(wt/wt)의 범위가 약 0.03:1~0.3:1인 경우 및 여러 가지 양의 콜레스테롤과 중성의 음화전 또는 포화된 인지질을 함유한 지질조성물에서 얻을 수 있다.

독소루비신-약물방출의 지질조성에의 의존성

생체의 독소루비신 방출 특성으로부터 지질조성의 의존성을 알 수 있다. 콜레스테롤을 함유하는 제제들은 약물방출에 내성이 컸고 콜레스테롤과 난포스타티딜 글리세롤을 함유한 것들은 약물방출 특성이 EPC만을 함유한 것과 EPC/콜레스테롤을 함유한 것의 중간정도이었다.

독소루비신-독성

본 발명의 리포좀 형태로 투여된 독소루비신은 유리형태의 독소루비신 보다 독성이 거의 없는 것으로 나타났다. 쥐에 있어서 리포좀 독소루비신의 독성 평기에 의하면 중량감소는 거의 없는 반면 급성 LD50값은 2.3배 증가하고 있다.

쥐의 걸보기 LD50은 지질조성에 의존성을 가지고 있었다. 리포좀 독소루비신의 LD50은 리포좀의 콜레스테롤 함량이 0%에서부터 약 45mol%까지 증가하거나 지질 제제중에 DSPC가 함유될 때 증가하고 있다.

리포좀 독소루비신의 급성독성은 직경범위가 약 0.15~1.4μm인 소포크기에 대해서 비교적 반응성이 없었고 약 150nm이하에서는 약간 증가하였다.

리포좀 표면하전과 크기같은 변수는 지질 조성의 변화의 경우에서와 같이 리포좀 독소루비신의 급성독성을 상당히 변화시키지 못한다. 더우기 DSPC/콜레스테롤을 사용하면 LD50을 상당히 증가(200mg/kg)시키는데 이 것은 함입된 EPC/콜레스테롤과 유리상태 약물 각각에 대해 관찰된 것보다 4~10배나 큰 것이다. 이러한 제제는 심장, 폐 및 신장 조직에 있어서 약물 축적수준이 극히 낮다. 약물 대 지질의 비를 증가시키면 독소루비신 독성의 경감에 큰 영향을 준다. 이전까지의 연구에서는 종래의 함입기술에 의한 독소루비신 함입에 있어 제한을 받기 때문에 이러한 효과를 찾아내지 못하였다. 이러한 약물의 힘입은 간장에 의한 흡수가 된 다하더라도 급성 간장손상은 관찰되지 않는다.

리포좀 제제의 효능

여러가지 지질조성, 리포좀 크기 및 약물 대 지질의 비를 가진 본 발명의 리포좀 항증양성 제제의 효능을 L1210 립프선 백혈병 모델을 사용하여 수컷 DBA/2마우스에 대해 시험하였다. 유리약물과 리포좀 제제의 항증양 효과를 이 모델을 사용하여 분석했다. 동물들에게는 리포좀 제제의 최대 허용용량(MTD)을 투여하였고, 이들의 생존 기간증가(ILS)를 처리하지 않는 기본 대조군에 대해 측정하여 유리 독소루비신의 ILS와 비교하였다.

빈크리스틴(Vincristine)-독성 및 효능

빈크리스틴의 경우에 있어서 약물과 리포좀을 결합하여 유리 약물보다 독성이 없고 복수(腹水) L1210 종양 선에 대해 효능이 있는 약물을 제조하는데 단 이 모델에 있어서 유리약물은 아무런 효능이 없는 것이다.

리포좀-제조

몇가지 방법을 사용하여 본 발명의 리포좀을 제조한다. 예로서 다층소포(MLV_s), 안정한 복층소포(SPLV_s) 또는 역상 중발법소포(Rev_s)를 사용한다. 바람직한 것은 필터 기공크기의 의존하는 크기의 LUV_s를 형성하는 필터를 통해 MLV_s를 압출하는 것이다. 기공크기가 30, 50, 60, 100, 200 또는 800nm인 폴리카보네이트 필터를 사용한다. 이 방법에 있어서 Cullis 등의 방법(PCT Publication No. WO 86/00238, 1986. 1. 16)을 사용하는데 리포좀 혼탁물을 반복해서 압출장치를 통과시킴으로써 균일한 크기의 리포좀을 제조한다. 예를 들자면 곧은 막필터(Nucleopore 폴리카보네이트필터) 또는 꼬불꼬불한 필터[Nucleopore membrafil filter(혼합 셀룰로오스 애스테르), 크기 0.1μm] 속으로 통과시켜 처리한다. 본 발명의 리포좀은 직경이 약 30nm~약 2미크론인데 바람직하게는 약 50nm~300nm, 보다 바람직하게는 약 60nm~300nm, 가장 바람직하게는 약 100~300nm이다. 이 크기범위는 MLV_s, SPLV_s 또는 LUV_s의 리포좀을 포함한다. 본 발명에 있어서 약 100nm~약 300nm인 단일종 리포좀이 바람직한데 이러한 리포좀이 LUV_s이다. SUV_s의 크기범위는 약 25~50nm이다.

겔에서 액체로의 결정질 전이온도(T_c)가 실온이상인 지질을 상용할 경우 가열된 바렐(barrel:thermojacket)을 가진 압출기를 사용한다. 이러한 장치는 리포좀의 혼탁물의 온도를 상승시켜 주기 때문에 이를 LUV_s의 입출이 가능하게 해준다.

열자켓(thermojacket)이 구비된 압출기에서 사용되는 이러한 지질에 속하는 것으로는 DSPC, DPPC, DMPC 및 DAPC가 있다. 이를 지질을 콜레스테롤과 55:45의 몰비로 혼합한다. DSPC를 함유하는 리포좀은 약 65°C에서 입출하고 DPPC의 경우에는 약 45°C에서 그리고 DAPC의 경우에는 약 85°C에서 입출하거나 지질의 T_c보다 약 5°C 높은 온도에서 입출한다. 본 발명의 또다른 실시태양은 T_c가 주위온도보다 높은 이들지질을 사용하는 LUV_s를 제조한다. 종래의 방법은 이러한 지질을 사용하여 음파피쇄처리가 포함되는 소형의 소포를 만드는 것인데 여기서 SUV_s가 만들어진다.(크기 범위는 약25~26nm).

사슬 길이가 긴 포화된 소포로 되어 있는 본 발명의 대형 단일 층 소포의 크기는 약 60nm~약 300nm이다. 이들 LUVs는 항증양제 같은 생체활성제를 함입한다. 사슬길이가 긴 불포화 지질이 있는 LUVET계를 사용하면 균일한 크기분포를 기진 LUVs가 된다. 이것은 균일한 소포분포의 것이다. 소포가 균일한 것은 거의 크기기 같은 리포솜으로 된 것이며 입자크기가 기우스 분포를 가지고 있다. 이러한 집단을 균일한 크기분포라 하고 크기에 대해서 단일양식이다. 단일양식이란 입자크기에 있어 폭이 좁은 다분산성을 가진 집단이고 입자들은 단일 모우드이다.

준단성평산린법으로 측정할 경우 집단에 가우스 분포가 있고 2차 다항식이 시료의 자기상관 함수의 자연 대수에 맞게 되면 리포솜 집단은 단일양식이 된다(Koppell, 1972, J. Chem. Phys., 57:4014). 이것이 잘 맞아 떨어질수록 단일양식의 특성이 양호해진다. 이러한 균집성은 시료의 치(chi), 제곱값(χ^2)이 1.0에 얼마나 근접되어 있느냐에 따라 결정된다. χ^2 값이 2.0이하이면 단일양식 집단을 나타낸다. 본 발명의 실시에 있어서 기타 크기 축소방법을 사용한다. 예를 들자면 분쇄방법을 성공적으로 사용할 수 있다. 이런 방법에 의하여 크기분포에 있어 균일하거나 단일양식인 리포솜을 얻게 된다.

리포솜 제조도중 유기용매를 사용하여 지질을 용해시킨다. 적당한 유기용매는 여러가지 극성과 유전총성을 가진 것으로서 지질을 용해시키는 것들인데 제한된 것은 아니지만 클로로포름, 메탄올, 디메틸су魄시드(DMSO), 염화베릴렌 및 용매혼합물[예:벤젠:메탄올(70:30)]등이 있다. 결과적으로 (각 성분들이 균일하게 분포되어 있는 혼합물로서) 지질을 험유하고 있는 용액이 만들어진다. 이들의 생체적 합성, 저독성 및 인화성에 입각해서 용매를 선택한다.

발명의 한가지 실태양은 임상에서 약제를 함입할 수 있는 3성분의 리포솜-항증양제 처리계이다. 약물이 독소루비신 또는 빙크리스틴 또는 리포솜의 내부가 산성인 막투과 pH기울기에 응답하여 부가되는 기타 항증양제인 경우에는 개의 1차성분(바이알 1)은 산성용액, 예컨대 시트르산원총액(300mmol., pH 3.8-4.2바람직하게는 pH 4.0)중의 리포솜이다. 2차성분(바이알 2)은 염기인데 pH 11.5인 0.5M의 탄산나트륨 또는 비스인산나트륨이 바람직하다. 3차성분(바이알3)은 항증양제이다. 위에 나온 치료계를 1차 바이알에는 산성매체중에 리포솜을 험유한 것이고 2차 바이알에는 염기를 함유하며 3차 바이알에는 항증양제(예:독소루비신)이 있는 3-바이알계로 해서 제공하게 된다. 리포솜의 내부가 비교적 염기성(예:5-FU)인 막투과 기울기에 응답하여 부가하는 약물을 사용할 경우에는 개의 1차성분은 비교적 염기성인 완충액(예:pH 6.8-11.0, 바람직하게는 pH 9.6인 탄산나트륨)중의 리포솜이다. 2차성분은 비교적 산성인 용액인데 예로서 황산칼륨 150mM/HEPES 150mM로 된 pH 7.4의 완충액이다. 3차성분은 항증양제이다. 리포솜에 있어서 pH 기울기를 형성(1차 바이알과 2차 바이알을 혼합함)한 다음 리포솜을 가열해서 약물과 혼합한다.

독소루비신, 빙크리스틴 및 FU를 부가할 경우 약 60°C까지 리포솜을 가열하는 것이 유리함이 확인되었다. 다우노루비신, 에피루비신, 미토크산트론 및 빙크리스틴은 25°C에서 효율적으로 부가된다.

위에 나온 바이알계를 독소루비신을 부가할 때 사용할 경우 각 성분들을 혼합한 즉시 다음 방법에 따라 사용한다. 바이알 2의 탄산나트륨 용액을 바이알 1의 리포솜에 가해서 된 혼합물을 상승된 온도(예컨대 60°C의 수증욕)에서 약 5-10분 가열한다. 혼합된 탄산염과 리포솜용액은 항증양제(독소루비신)와 락토오스를 함유한 바이알 3에 가한다. 이 바이알을 혼합한 다음 가열도중 5분마다 혼합하면서 상승된 온도(예:60°C)에서 가열한다. 여기서 얻는 리포솜-약물혼탁액을 정성적인 식염수 또는 5% 텍스트로오즈로 묽개 한다.

최종용액의 pH는 6.9-8.0 바람직하게는 pH 7.5이다.

빙크리스틴을 부가할 경우에 있어서 위의 방법을 사용하지만 혼합순서를 변경한다. 예로서 빙크리스틴을 산성pH(pH 4.0)에서 리포솜과 혼합한 다음 비교적 염기성인 용액을 첨가하여 pH 기울기를 설정한다.

분광분석검정

본 발명의 항증양 검정법에 있어서 pH 의존성의 스펙트럼 응답(예: 적외선, 자외선 또는 가시광선)에 따라 리포솜 제제중에 있는 유리약물과 리포솜이 함입된 항증양성 약물의 비율을 측정한다. 예로서 pH가 약 7.0 일때는 독소루비신은 489nm에서 최대 흡광도를 나타내는 반면 일칼리성 pH(약 10.0)에서는 550nm와 592nm에서 흡광피크가 나타난다(제15도). 따라서 리포솜중에서의 유리 독소루비신의 농도는 소피외부의 배체를 수산화나트륨같은 염기를 사용하여 일칼리화한 후 600nm에서 흡광도를 관찰하여 측정한다.

지질 2중층이 일칼리성 외부배체로부터 함입된 독소루비신을 분리할 수 있기 때문에 이러한 방법에 의하여 유리독소루비신의 스펙트럼을 이동시키기는 하지만 리포솜에 함입된 독소루비신의 스펙트럼을 이동시키지는 않는다. 따라서 여기서 얻는 0.0-600은 제제중의 함입되지 아니한 독소루비신의 양을 나타내는 것이다. 그러므로 Triton X-100를 사용하여 리포솜을 용해한 다음 측정을 반복함으로써 총 독소루비신 농도를 정량화 한다. 600nm에서의 흡광비는 표준칼럼 크로마토그래피법으로 검지되는 소포제제중의 유리독소루비신의 백분율에 비례한다.

함입되지 아니한 약물의 함량은 H₂O에 일칼리화한 후 얻은 흡광도를 Triton X-100 존재하에 관찰된 흡광도로 나눈 비로 결정된다.

리포솜 독소루비신 제제의 분광분석을 칼럼 크로마토그래피법과 비교하였는데 이 방법은 유리약물과 소포가 관련된 약물을 직접 측정하여 광범위한 함입효율 범위에 걸쳐 흡광비값을 실제의 유리 DOX/총 DOX의 비율에 비교해 보는 것이다. pH기울기는 리포솜속으로 들어가는 독소루비신의 흡수를 유발하여 [DOX]_{in}/[DOX]_{out} 비가 [H⁺]_{in}/[H⁺]_{out} 비를 나타내게끔 하기 때문에 여러가지 크기의 pH 기울기(내부는 산성)를 나타내는 EPC/콜레스테롤 리포솜을 사용해서 10%에서부터 99%까지의 함입효율을 가지는 리포솜계를 구성하였다. 제5도는 600nm에서의 흡광비가 전범위의 함입효율에 대해 소포제제중에 있는 유리독소루비신/총독소루비신의 비를 나타내는 것이다. 분광분석법은 소포제제중 독소루비신이 수동적으로 함입되게 하여 이런 결과들이 능동적인 함입에서 얻은 리포솜 독소루비신에만 특징적이 되지 않게 하는 EPC리포솜에 대하여 완성된 것이다. 제5도를 보면 이 시료에 있어서 600nm에서는 흡광비는 칼럼 크로마토그래피에서 얻

은 유리독소루비신/총독소루비신 비율의 값과 상관관계가 있다.

스펙트럼 이동의 흡광특성에 의하여 리포좀 제제중의 유리독소루비신의 상대적인 양을 육안으로 평가할 수도 있다. 이러한 분석법이 정성적인 것일지라도 유리약물 5%를 검출할 수 있고 유리약물 15% 이상을 나타내는 계에 있어서 색상변화를 관찰하게 된다.

과학장비를 사용하지 않고서도 이 방법으로 리포좀 독소루비신을 육안으로 평가할 수 있기 때문에 시료를 점검한 즉시 생체내에 사용하여 위험한 수준의 유리약물이 존재하는가의 여부를 확인한다.

독용액의 pH의 함수로서 피아크의 스펙트럼 이동을 모니터링 함으로써 항종양 약물에 대한 분광분석 검정법의 유용성을 결정한다. 약물을 함유한 리포좀을 파괴하고 방출되는 약물을 가시광선, 자외선 또는 적외선등의 영역에서 측정한다. 흡광도의 차이를 위의 독소루비신 시료의 경우처럼 정량화하고 시료중에 있는 유리약물의 백분율을 계산한다.

본 발명의 다른 특징을 볼 것 같으면 3-바이알계에는 본 발명의 분광분석에서 독소루비신의 힘입을 시험하는 0.1N 수산화나트륨(NaOH) 같은 알칼리화제로 사용되는 힘입표지를 용액을 함유하는 제4의 시험바이알이 포함된다. 바이알 3에서 함유된 물은 리포좀 독소루비신 제제의 .분취액(0.5ml)을 NaOH 용액에다 첨가하고 여기서 생기는 색깔을 칼라차아트와 비교한다. 또다른 방법으로서 제조된 용액의 흡광도를 분광 분석적으로 판독하는 것이다. 흡광도에 따라 독소루비신과 수산화나트륨과의 반응에 의하여 적색에서 청색으로 나타난다. 적색 또는 청색정도는 힘입량에 따라 달라진다.

리포좀 탈수 및 저장

본 발명의 방법으로 제조된 리포좀을 여러 제조단계에서 동력 건조하거나 탈수한다. 예컨대 용매를 제거하고 나서 약물에 첨가하기전에 지질필름을 동결 건조시킨다. 또다른 방법으로는 리포좀을 수화 처리하기 전에 지질-약물 필름을 동결 건조시키는 것이다. 이러한 탈수법은 지질이나 리포좀을 감압하에 노출시킴으로써 혼탁되고 있는 모든 용매를 제거함으로써 이루어지는 것이다.

공지의 방법에 따라 [Bally et al., Publication No. 86/01102, 1986. 2. 27. Encapsulation of Antineoplastic Agents in Liposomes; Janoff et al., PCT Publication No. 86/01103, 1986. 2. 27. Dehydrated Liposomes; Schneider et al., U.S. Patent No. 4,229,360, 1980. 10. 29] 천수제 존재하에 리포좀을 탈수한다. 또한 수화된 리포좀 제제는 액체질소 분위기에서 주위의 매체중에 리포좀을 두고 얼린 다음 탈수처리 한다. 얼리기전의 탈수는 공지방법에 따라 [Bally et al., PCT 출원 제86/01103, 1986. 2. 27 공고] 제조된 제제중에서 설정같은 한가지 이상의 보호제 존재하에 실시한다. 이런 방법에 의하여 제제를 장기간 저장할 수 있고 안정성도 길어진다. 예컨대 리포좀-항종양제를 설정:지질의 중량비 약 0.5:1-약 50:1, 바람직하게는 약 20:1에서 설정용액과 혼합하는 것이다. 재차 수화시키면 이러한 리포좀은 이공크기가 100-200nm인 리포좀에 있어서 거의 모든 항종양제를 유지하게 된다. 바람직한 실시태양에 있어서 설정으로서는 만니클:글로코오스:락토오스가 중량비로 2:1:1인 것이 있다. 증류수에서 재차 수화시킨 다음 제제를 60°C에서 10분간 가열하는 것이 좋다.

기타 적당한 방법을 사용하여 위에 나온 리포좀 재제를 탈수 처리한다. 사전에 얼림이 없이 리포좀을 탈수해도 된다. 일단 리포좀이 탈수되면 사용시까지 장기간 저장할 수 있다. 적당한 저장온도는 리포좀의 지질 조성과 캡슐화된 물질의 온도민감성에 따라 달라진다. 예로서 각종 항종양제는 열에 불안정하므로 이러한 것들을 함유하는 탈수된 리포좀을 약 4°C 정도의 냉동 조건하에 저장하여 약효가 상실되지 않게 해야 한다. 또한 이러한 약제에 있어서 탈수법을 실온보다는 낮은 온도에서 실시하는 것이 좋다.

탈수된 리포좀을 사용할 경우 증류수나 적당한 완충액을 리포좀에 가하고 재차 수화시킴으로서 재수화 처리한다. 용액을 완만하게 저어주면서 수용액중에 리포좀을 재현탁시킬 수 있다. 실온 또는 리포좀의 조성과 이들의 내부 내용물에 대하여 적절한 온도에서 재수화시킨다. 투여할 항종양제를 약물대 지질의 비가 큰 리포좀에 가한 다음 탈수시키고 조성변화가 그 이상 더 일어나지 않아야 할 경우에는 재수화된 리포좀을 암치료에 직접 사용하는데 이것은 리포좀에 캡슐화된 약물을 투여하는 방법에 따른다. 또한 위에 나온 막투과 pH 기울기법을 사용하여 이온화성 항종양제를 재수화된 리포좀에 가한 직후 투여한다. 이러한 접근방법과 관련하여 막투과 pH 기울기가 나타내도록 하는데 사용된 능도기울기는 위에 나온 외부매체 교환법을 사용하여 재수화 처리한 후 또는 달수전에 나타난다. 예를들자면 약물을 대 지질의 비가 큰 리포좀을 탈수한 후 즉 1차 외부매체로부터 탈수하고나서 막투과 pH 기울기가 설정되는 것이다. 재차 수화처리함에 있어서 리포좀과 비교적 산성 또는 염기성의 pH를 가진 2차 외부매체와 혼합함으로써 pH 기울기가 설정된다. pH 기울기가 설정되고 난뒤 또는 설정됨과 동시에 항종양제와 리포좀을 혼합한다.

막투과 pH 기울기가 설정되고 나서 리포좀을 탈수할 경우에 있어서는 중성매를 가진 수용액과 리포좀을 혼합함으로써 리포좀을 재차 수화시킨다.

예컨대, 1차 외부매체로서 시트르산 완충액을 함유한 리포좀을 사용하는 위에 나온 경우에 있어서는 독소루비신같은 항종양제와 탄산나트륨을 첨가함으로써 재수화단계를 진행시키는 것이다. 이미 염기(예: 탄산나트륨)을 가지고 있으므로 해서 이미 막투과 pH 기울기가 있는 리포좀을 재수화처리할 때는 물이나 기타 중성 수용액과 독소루비신을 기한다. 마지막으로 막투과 pH 기울기를 기시고 있고 독소루비신을 함유한 리포좀을 탈수시킨 경우에 있어서는 물이나 기타 수용액을 사용하여 재수화시킨다. 또다른 방법으로는 기타 항종양제를 필요에 따라 첨가하는 것이다.

본 발명의 약제학적 제제와 항종양제 및 이들 방법에 의해 제조된 것들을 함유하는 리포좀을 동물(사람포함)에 사용하여(1) 반복투여, (2) 생체활성형으로 약물의 지속적인 방출, 또는 (3) 해당유리 약물과 비교해서 적당한 효능을 가진 저독성을 필요로 하는 감염이나 조건을 치료한다. 이러한 조건으로는 한정된 것은 아니나 항종양제로 치료될 수 있는 것들과 같은 종양들이 있다.

항종양제와 이들의 약제학적 제제를 함유하는 리포좀의 투여방식에 따라 화합물이 전달되는 기관의 위치와 세포가 결정된다.

본 발명의 리포좀을 단독으로 투여할 수 있으나 대개는 목적으로 하는 투여경로와 표준약제학적 실무에 있

어서 선택되는 약제학적 덤체와 더불어 투여한다. 제제를 정맥내 같은 비경구식으로 주사해도 된다. 비경구 투여의 경우에 있어서 예컨대 용액을 등장성으로 만드는 충분한 염이나 르루코오스같은 기타 용질을 함유하는 무균의 수용액형태로 하여 사용한다. 독소루비신 리포좀의 경우에는 최소한 약 $20\text{mg}/\text{m}^3$ 의 용량으로 해서 60분간 정맥내에 주사할 수 있도록 한다. 또한 이들을 복막세척이나 척수강내에 주사로 투여할 수도 있고, 림프절 혼합감염 부위에 피하투여할 수도 있다. 제제의 특수한 성질에 따라 기타 여러가지 용도를 생각할 수 있다.

경구투여 형식에 있어서 본 별명의 항종양제 약물 제제함유 리포좀을 제제, 캡슐, 트로키네, 분말, 시럽, 액리시트, 수용액 및 혼탁액들의 형태로 사용한다. 제제의 경우 사용기능한 담체로는 액토오스, 시트르산나트륨 및 인산염이 있다. 전분같은 각종 봉해제와 마그네슘 스테아레이트, 소다음 라우릴 슬레이트 및 활석같은 윤활제를 이 정제에 보편적으로 사용한다. 캡슐형의 경구투여의 경우에 있어서, 유용한 희석제는 액토오스와 구분자랑의 폴리에틸렌 글리콜류이다. 경구투여용으로 혼탁액이 필요한 경우에는 활성첨가 성분을 유화제 및 혼탁제와 혼합한다. 필요에 따라서는 감미제나 향미제를 첨가한다.

국소투여의 경우에는 본 별명의 항종양제 약물 제제함유 리포좀을 젤, 기름, 에밀전등의 제형에 첨가한다. 이러한 제제를 크림, 페이스트, 연고, 젤, 로우션등과 같이 직접 사용함으로써 투여한다.

종양성질환을 치료, 증상경색, 지연, 예방하기 위해 인간에게 투여할 경우에 있어서 처방을 하는 의사는 환자에 대해 항종양성 약물의 적절한 투여량을 궁극적으로 결정해야 하는데, 이같은 환자의 질환이나 그 특성 및 건강, 나이, 체중등에 따라 여러가지로 달라진다. 리포좀 형태의 약물투여량은 유리약물에 애해 사용되는 것과 같은 정도로 하는 것이 일반적이다. 그러나 어떤 경우에 있어서는 이를 한계를 벗어나서 투여할 필요가 있다.

본 발명을 실시예에 따라 설명한다.

실시예 1

시험관속에 있는 EPC/콜레스테롤(몰비 1:1) 200mg에다 시트르산(150mM 1.0ml, pH 4.0)을 가하고 시험관을 5분간 소용돌이 식으로 혼합해서 용액을 균질히 분산시키므로 MLV를 얻었다. 이 시료를 2.0ml 들이의 저온 바이알에 옮기고 액체질소중에 2분간 침지한 다음 수증육중에서 40°C 에서 가열하여 시료를 완전히 용액화시켰다. 동결단계에 들어가지 직전에 시료를 소용돌이식으로 혼합하면서 동결-해동사이클을 7회 반복함으로써 FAMLV를 얻었다. 이어서 시료를 LUVET 법에 따라 2층으로 된 $0.2\mu\text{m}$ 폴리카보네이트 필터속으로 7회 압출하였다. 이 시료를 원출되지 아니한 0.85% 염수로 2회 희석하였다. 리포좀 용액을 5분간 60°C 로 애열한 후 분말상 독소루비신($22.2\text{mg dox}/100\text{mg 지질}$)과 분말상 탄산수소나트륨($3.75\text{mg}/22.2\text{mg dox}$)을 함유한 바이알에다 가하였다. 이 시료를 5분간 60°C 로 가열하고 간헐적으로 소용돌이식으로 혼합하였다.

실시예 2

300mM 시트르산(pH 4.0)과 지질농도가 $100\text{mg}/\text{ml}$ 인 것을 사용하여 실시예1의 방법에 따랐다. 리포좀을 염수로 희석하지 않고 탄산수소나트륨을 희석제로 첨가함으로써 외부 pH를 약 8.0정도 되게 한 다음 독소루비신을 첨가했다.

실시예 3

독소루비신을 능동적으로 캡슐화한 리포좀은 300mM 시트르산 원총액(pH 4.0) 중에서 EPC 필름(CHCl_3 에서 건조시킨 후 고진공하에 12시간 처리한 것)을 수화처리하여 지질의 최종 농도를 $100\text{mg}/\text{ml}$ 되게 함으로써 제조한 것이다. 이를 MLV를 동결-해동 사이클에서 5회 처리하고 나서 LUVET 법에 따라 기공크기가 $0.2\mu\text{m}$ 인 폴리카보네이트 필터속을 통해 5회 압출하였다. 이어서 리포좀을 $10.0\text{M Na}_2\text{CO}_3$ 을 사용하여 pH 7.5되게 조절한 다음 60°C 에서 5분간 독소루비신과 함께 혼온처리했다.

수동적으로 독소루비신을 캡슐화한 리포좀은 위에서 나온 재료를 사용하여 원총용액($20\text{mM HEPES}, 150\text{mM NaCl}, \text{pH }7.5$)중에서 독소루비신을 혼탁시켜 2.0mM 의 독소루비신을 얻은 다음 지질을 수화처리함으로써 제조한 것이다. 위에서와 마찬가지로 리포좀을 동결-해동 사이클에서 처리한 후 압출하였다. pH 4.0에서 원총액중에서 소포를 제조하고 $1.0\text{M Na}_2\text{CO}_3$ 을 사용하여 외부 pH가 7.5 되게 한 후 소포(20mM 지질)를 60°C 에서 5분간 독소루비신($10\text{mg}/\text{ml}$)과 더불어 혼온처리함으로써 독소루비신의 함입 처리를 실시하였다.

리포좀 제제의 함입효율을 측정하기 위하여 Shimadzu UV-160 분광분석기를 사용해서 다음 방법에 따라 유리상태 및 리포좀에 캡슐화된 독소루비신을 분광분석식으로 모니터링 하였다. 리포좀 독소루비신 시료를 $200\text{mM HEPES}, 250\text{mM NaCl}$ (pH 7.5)로 희석하여 독소루비신의 농도가 0.05-0.10mM 되게 하였다. 측정순서를 다음과 같이 하였다: (1) 희석된 시료의 600nm 에서의 흡광도를 조절하여 0으로 한다. (2) $1.0\text{N NaOH}(0.02\text{ml}/1.0\text{ml}$ 시료)를 사용하여 시료를 pH 4.0의 알칼리성으로 하고 600nm 에서의 흡광도를 2분이내에 기록하였다. (3) 0.2%Triton X-100 용액에 대하여 분광분석기를 0으로 조절하였다. (4) Triton X-100이 첨가된 리포좀-독소루비신 시료(0.02ml 20% Triton X-100 wt./wt./시료 1.0ml)의 600nm 에서의 흡광도를 측정했다. NaOH 첨가시의 600nm 에서의 흡광도를 Triton X-100 첨가후의 흡광도를 나눈 값을 유리독소루비신:총 독소루비신의 비로 하였다.

pH 의존성의 스펙트럼 응답법을 실제의 유리상태의 함입된 약물함량에 관계를 가지게 하기 위해 소포에 함입된 독소루비신을 다음과 같이 측정했다. $20\text{mM HEPES}, 150\text{mM NaCl}$ (pH 7.5)로 평형화된 Sephadex G-50 칼럼속으로 리포좀-독소루비신 용액의 소량 분취액을 통과시켜 리포좀과 결합한 약물로부터 유리상태로 분리했다. 최초 용액의 분취액과 용리물을 함유한 리포좀을 인분석과 480nm 에서의 광학밀도를 이용하여 인지질과 독소루비신의 분석을 하였다(Mayer et al., (1986), Biochim Biophys. Acta., 857:123).

EPC/콜레스테롤(55:45 mol:mol)을 총지질 ml 당 10mg 을 사용하여 위의 방법을 반복했다.

실시예 4

pH 4.2, 5.2, 5.7, 6.7 및 7.2의 시트르산을 사용하여 실시예 3의 물질과 방법을 실시했다. 제5도로부터

전 범위의 함입효율에 대하여 소포제제종에 있는 유리독소루비신/총독소루비신의 비율을 흡광도비(Abs.₆₀₀/NaOH/Triton X-100 첨가후의 Abs.₆₀₀)가 정확히 나타내고 있음을 알 수 있다.

실시에 5

리포좀 분취량(0.2ml)을 1.0N NaOH에 첨가하여 나오는 색상을 칼리차아트와 비교함으로써 리포좀에 함입된 독소루비신의 함입효율을 모니터링한 것 외에는 실시에 3의 물질과 방법을 사용하였다.

실시에 6

EPC/콜레스테롤 (55/45 mol/mol 비)을 37°C에서 12시간동안 감입하에 건조시켜 클로로포름으로부터 박막을 얻었다. 시트르산(pH 4.0의 150mM 1.0ml)을 가하고 필름을 헌탁시켰다. 여기서 얻은 MLV를 실시에 1에서처럼 동결-해동 사이클을 7회 반복한 뒤 LUVET 법을 사용하여, 200nm 폴리카보네이트 필터속을 통해 5회 입출하였다. 준탄성 광산란법(QELS:quasielastic Light scattering)으로 위에서 얻은 리포좀의 크기분포를 측정하여 동결파편의 전자현미경법으로 일반적인 형태를 관찰했다. 입축된 소포용액에다 살균된 염수(1.0ml)를 가하여 총지질 엉도가 100mg/ml되게 하였다. 리포좀의 외부 pH를 1.0N NaOH를 써서 적정하여 7.5되게 했다. 이 리포좀용액(1.0ml)과 분말상의 독소루비신(22mg)(Na₂CO₃ 1mg/독소루비신 6mg 함유)을 간헐적으로 혼합하면서 60°C에서 3분간 가열하였다.

실시에 7

실시에 6의 물질과 방법을 사용하여 리포좀-독소루비신 제제의 생체의 안정성을 측정했다. 방출실험은 다음과 같이 실시하였다. 10배 희석된 리포좀시료를 20mM HEPES, 150mM NaCl (pH 7.5) 1000 체적에 대해 37°C에서 24시간 투석하였다. 1, 2, 4, 8, 10 및 24시간 되는 때에 150μl을 분취하여 함입된 독소루비신을 측정하였다.

실시에 8

소포를 기공크기가 1.0마이크론인 필터속을 통과시키고 시료의 혈청안정성을 측정하는 것 외에는 실시에 3의 물질과 방법을 사용하였다. 희석된 리포좀-독소루비신 시료를 20체적의 신선한 인간혈청으로 끓개하고 37°C에서 향온처리했다. 1, 2, 4, 8, 12 및 24시간 되는 때에 500×g에서 5분간 원심분리하여 소포를 펠릿화하고 20mM HEPES, 150mM NaCl pH 7.5에서 2회 세척한 후 앞서와 마찬가지로 인지질과 독소루비신에 대해 분석하였다.

실시에 9

독소루비신 리포좀의 함입효율을 다음과 같이 분석하였다.

실시에 6에 따른 함입방법을 끝마친 후에 20mM HEPES, 150mM NaCl (pH 7.5)를 사용하여 독소루비신-리포좀 20μl을 희석하여 20μl 되게 하였다. 희석된 시료의 분취액(20μl)을 공지방법(Bartlett, J. Biol. Chem. 1959, 234: 466-468)에 따라 리피드 포스테이트에 대해 분석했다. 희석된 제제의 두 번째 시료 20μl을 유리시험관에 넣고 여기에 Triton X-100(1% w/w 1.0ml)을 첨가했다. 시료를 수중욕조에서 40°C에서 2분간 가열하고 소용돌이식으로 혼합했다. 시료의 흡광도를 분광분석기에서 480nm에서 판독하였다.

20mM HEPES, 150mM NaCl (pH 7.5) 중에서 길로 사전 팽윤된 1.0ml 용량의 Sephadex G-50(중간등급) 칼럼을 만들었다. 500×g에서 3분간 칼럼을 원심분리했다. 독소루비신-리포좀을 칼럼에 가한 다음(희석된 시료 10배량인 150μl) 원총액 50μl을 가하고 3000rpm에서 5분간 원심분리하였다. 용리액을 혼합하여 균일하게 하였다. 분취액(25μl)을 사용하여 위에서와 마찬가지로 인산염과 독소루비신에 대해 분석하였다.

실시에 10

실시에 2의 물질과 방법을 그대로 사용하였고, 여기서 얻은 리포좀을 무균의 생리식염증에서 혼합하여 5mg 용량이 0.2ml 중에 포함되어 투여될 수 있는 주사액을 만들었다.

체중이 18-20g 되는 DBA/2 마우스(mouse) 여려마리를 6-10마리씩으로 두 무리로 나누었다. 이들 마우스에게 1.5×10^6 의 L1210 종양세포를 복강내 주사하였다. 종양주사를 한지 24시간 경과후 치료를 시작하였는데 꼬리정맥을 통하여 투여했다. 평균체중 기준으로 리포좀-독소루비신으로 동물을 치료했다. 마우스의 체중을 매일 측정하였다. 생존시간을 일수로 기록하였고 평균 및 중간생존시간을 계산하였다.

위에 나온 방법을 반복하여 물비가 각각 55:45인 EPC/콜레스테롤과 DSPC/콜레스테롤 투여, 리포좀-독소루비신 투여, 멀균된 염수를 사용한 대조군 치료 및 독소루비신이 없는 리포좀을 사용한 대조군치료에 적용하였다.

실시에 11

유리 독소루비신과 리포좀-독소루비신을 비교하는 LD₅₀연구를 다음과 같이 실시하였다.

평균체중이 20-25g인 CD-1 마우스 여려마리를 6-10 마리씩으로 하여 여러 무리로 나누었다. 독소루비신을 멀균된 주사용 염수증에 용해시켜 200μl 체중의 용량으로 만들었다. 체중1kg당 10mg의 투여량을 꼬리정맥에 주사하여 투여했다. 주사후 각각 7일 및 14일 되는 날 체중과 사망률을 기록하였다.

마찬가지로 여러마리의 마우스가 물비가 55:45인 EPC/콜레스테롤을 사용하여 실시에 5에 따라 제조한 리포좀-독소루비신을 주사하였다. 리포좀을 멀균식염수로 희석하여 적당한 용량의 독소루비신을 투여하였다. 위에 나온 바와 같이 여러마리의 마우스의 꼬리정맥에 총체적 200μl로 주사하여 용량이 100mg/체중kg되게 하였다. 주사후 각각 7일 및 14일 되는 날 체중과 사망률을 기록하였다.

위의 방법을 반복하여 15, 20, 25, 30 및 40mg/체중kg의 용량으로 하여 유리독소루비신을 투여하였다.

위의 방법을 반복하여 20, 30, 40, 50, 60 및 80mg/kg의 용량으로 하여 리포좀 독소루비신을 투여하였다.

실시에 12

EPC/콜레스테롤(2.1:1 중량비)을 150mM 시트르산(pH 4.0)중에 분산시켜 총지질 200mg/원총액 1ml을 얻었다. 여기서 얻은 MLV를 혼합하면서 동결-해동사이클을 7회 반복하고나서 각각 동결단계로 들어갔다. 여기서 얻은 FATMLV를 기공크기가 0.2μm인 2층 필터속으로 5회 입출하여 VET₂₀₀을 만들었다. 리포좀을 원총 처리되지 않는 염수로 2배로 희석하고 IN NaOH로 pH가 7.5되게 하였다. pH 조절전의 리포좀 1.0ml 당량을 밀봉된 바이알(용량 20ml)중에 있는 Na₂CO₃ 3.7mg과 독소루비신/락토오스 133mg에다 가하였다. 리포좀과 독소루비신 함유 바이알을 60°C에서 5분 가열한 후 혼합했다. 혼합이 끝나면 리포좀을 60°C에서 5분간 가열했다. 시료를 실온까지 냉각하고 50μl을 분취하여 20mM HEPES, 150mM NaCl (pH7.5)로 물개 하여 0.5ml 되게 하였다. 이 시료중 일부를 취한 것(150μl)을 1.0ml의 Sephadex G-50 칼럼에 가하였다. 용리액과 최초 시료중에서 앞서처럼 포스페이트와 독소루비신을 정량했다.

실시에 13

총지질 200mg에서 EPC/EPG/콜레스테롤(0.95/0.05/1.0 몰비)을 사용하여 150mM 시트르산(pH 4.0)중에서 실시에 12에 따라 VET₂₀₀ 시료를 제조했다. 이 시료를 원총되지 않은 염수로 2회 물개하고 1.0N NaOH를 써서 리포좀의 외부 pH를 7.5되게 하였다. 이것을 60°C에서 5분간 항온처리한 후 일정량(3.5ml)을 취해 Na₂CO₃ 11.7mg를 함유한 독소루비신 70mg에 가하였다. 이 시료를 60°C에서 5분간 항온처리하면서 간헐적으로 혼합하였다.

실시에 14

수소첨가된 대두 pc(HSPC)콜레스테롤로 된 필름(HSPC/콜레스테롤 중량비 2.4:1, 총지질 400mg)을 pH 4.0의 300mM 시트르산 4.0ml을 써서 수화시켜 MLV를 만들었다. 이 용액을 기공크기가 0.2μm인 필터속으로 5회 압출하였다. 탄산수소나트륨의 일부를 압출된 리포좀에 가하여 60°C에서 3분간 애열했다. 리포좀의 일부(0.5ml)를 독소루비신에 가하고 혼합한 후 60°C에서 15분간 항온처리했다. 실시에 5에 나온 색상시험을 한 결과 험입효율이 95% 이상이었다.

실시에 15

EPC:콜레스테롤(중량비 2.4:1)과 300mM 시트르산/250mM 락토오스(pH 4.0)로부터 MLV를 제조하여 1ml당 총지질 100mg를 얻었다. 이를 MLV를 체적크기가 0.2μm Gelman 필터속으로 5회 압출하였다. 이 리포좀의 일부(1.0ml)를 9m용량의 시험관속에 넣고 48시간 진공건조 하였다. 이 재제를 재차 수화시키기 위해 물 950μl을 가하였다.

실시에 16

리포좀-독소루비신의 방출특성을 다음과 같이 측정하였다: EPC/콜레스테롤(몰비 55:45)을 클로로포름에서 건조시켜 500ml용량의 둥근바닥 플라스크에 박막을 만들었다(총지질 400mg). 이 필름을 pH 4.0의 300mM 시트르산 34.0ml로 수화시켜 MLV를 만들었다. 이를 MLV를 필터(2 stacked 0.22μm Nucleopore membrafil)를 통해 압출한 다음 필터(0.1μm Nucleopore membrafil)를 통해 10회 압출했다. 여기서 얻은 어액시료 1.0ml에다 1M Na₂CO₃ 275μl을 첨가함으로써 외부 pH가 8.3되게 하였다. 분취액(0.6ml)을 60°C에서 3분 가열하여 독소루비신 시료 100mg를 얻었다. 이 독소루비신 10mg에다 리포좀 분취액을 가하고 60°C에서 5분 가열하였다. 시료를 두 부분으로 나누었다. 첫번째 부분을 pH 7.5 30mM HEPES, 150mM NaCl로 10배 희석하였다. 두 번째 부분을 pH 4.0의 300mM 시트르산으로 10배 희석하였다. 이 두가지 시료를 투석용 용기애디 넣고 각각의 원총액 1000 체적에 대해 37°C에서 투석하였다. 1시간후 분취액 150μl을 각각의 원총액으로 평형화된 1.0ml Sephadex 칼럼을 통과시켜 독소루비신과 리피드 포스페이트에 대해 분석하였다.

위에 나온 방법을 되풀이하여 2.4.8.12 및 24시간에서의 투석실험을 하였다.

EPC/콜레스테롤/알파 토코페롤(55:45:1)의 리포좀을 사용하여 위의 방법을 되풀이 하였다.

실시에 17

독소루비신과 스트레이트와의 상호작용을 다음과 같이 평가하였다: 20mM HEPES, 15mM NaCl 원총액(pH 7.5) 0.5ml에다 25°C에서 독소루비신을 가하여 4mM 독소루비신 용액을 얻었다. 이 시료를 원심분리하여 침전물을 펠릿화하고 상청액을 분광분석법으로 독소루비신에 대해 분석하였다.

300mM Na 시트레이트(pH 4.0), 300mM Na 시트레이트(pH 5.0), 300mM Na 시트레이트(pH 6.0) 및 300mM Na 시트레이트(pH 7.5)의 각 원총액을 사용하여 위의 방법을 되풀이 하였다.

그 결과를 제3도에 그래프로 나타내었는데 여러가지 스트레이트의 pH값에 대해 행한 혼합실험을 하여 나타난 시트레이트-독소루비신 상호작용의 그래프이다. 원심분리한 후 용액중에 진존하는 독소루비신(mM)을 시트레이트의 pH의 함수로 플로트하였다. 즉

- * 검은 4각형: 4mM 독소루비신, 60°C에서 혼합한 후 25°C로 냉각.
- * 흰 4각형: 4mM 독소루비신, 25°C에서 혼합.
- * 검은 원형: 20mM 독소루비신, 60°C에서 혼합한 후 25°C로 냉각.
- * 흰 원형: 4mM 독소루비신, 비교용, 25°C 20mM HEPES, 150mM NaCl 중에서 혼합.

실시에 18

다음과 같은 혼합온도 조건에서 실시에 17의 방법대로 하였다: (1) 60°C에서 5분간 가열후 25°C로 냉각.

(2) 20mM 독소루비신을 사용하여 60°C에서 5분간 가열후 25°C로 냉각.

제3도에 그 결과가 그래프로 나와 있는데, 여러가지 시트레이트의 pH값에서 행한 혼합 실험에서 나타난 시트레이트-독소루비신 상호작용의 그래프이다. 원심분리후 용액중에 잔존하는 독소루비신(mM)을 시트레이트의 pH의 함수로 플로트하였다. 즉

- * 검은 4각형: 4mM 독소루비신, 60°C에서 혼합한 후 25°C로 냉각.
- * 흰 4각형: 4mM 독소루비신, 25°C에서 혼합.
- * 검은 원형: 20mM 독소루비신, 60°C에서 혼합한 후 25°C로 냉각.
- * 흰 원형: 4mM 독소루비신, 비교용, 25°C에서 20mM/HEPES, 150mM NaCl 중에서 혼합.

실시에 19

EPC와 콜레스테롤(몰비 55:45), (총지질 100mg 지질/ml 완충액)을 건조시켜 반응용기벽면에 박막을 형성시킨 후 300mM 시트레이트(pH 4.0)로 수화시켰다. 여기서 얻은 MLV를 필터(0.22μm Nuclepore membrafil filter)를 10회 통과시켜 크기를 축소시켰다. 탄산나트륨 분취액(1.0ml)을 이 리포좀에 기하여 외부 pH가 8.3되게 하였다. 혼탁액을 60°C에서 10분간 항온처리 하였다. 독소루비신을 이들 리포좀에 첨가하여 총 지질 100mg당 독소루비신 29±2mg을 얻고 혼탁액을 60°C에서 10분 항온처리하였다. 리포좀-독소루비신을 실시에 10의 방법에 따라 여리마리의 마우스에 투여했다.

실시에 20

리포좀 혼탁액을 필터(0.1μm Nuclepore membrafil filter)속을 10회 통과시킨 다음 필터(2 Stacked 0.1 μm Nuclepore membrafil filter)속을 10회 통과시킴으로써 크기축소를 하는 추가적인 단계를 실시하는 것 외에는 실시에 19의 방법과 물질을 사용하였다. 여기서 얻은 리포좀-독소루비신 혼탁액의 LD₅₀을 실시에 10의 방법에 따라 실시했다.

실시에 21

300mM 시트레이트(pH 4.0)중에서 지질 필름(염화 메틸렌에서 고진공에서 12시간 건조시킨 것)을 수화시켜 시트르산 용액 1ml당 총지질 100mg이 되게 하여 DSPC를 함유하는 리포좀을 만들었다. 여기서 얻은 MLV를 액체질소중에서 등결 해동을 7회 반복한 뒤 60°C에서 수분간 가열하고 나서 멀사켓 LUVET 입출장치를 사용하여 기공크기가 0.2μm인 폴리카보네이트 필터속을 통해 5회 입출시켰다. 입출된 리포좀의 외부 pH를 수산화나트륨으로 적정하여 pH 7.8이 되게 하였다. 이 리포좀 용액을 60°C에서 3분 가열한 후 약물 대 지질의 비가 0.25:1인 독소루비신과 혼합하여 60°C에서 5분간 혼합 가열한다. 시료 150μl을 완충된 식염수와 평형된 1ml Sephadex G-50 칼럼을 통과시켜 줌으로써 제제로부터 함입되지 아니한 독소루비신을 분리하였다. 이 방법에 의해 함입효율이 95%이상이 되었다.

실시에 22

탄산나트륨(1.0M)을 사용하여 제조된 리포좀의 pH를 8.0이 되게 조정하고 60°C로 유지하는 것 외에는 실시에 21의 물질과 방법을 사용하였다.

실시에 23

최종 약물 대 지질의 비(w/w)가 0.20인 DPPC/콜레스테롤(몰비 55:45)을 사용하여 실시에 22의 물질과 방법을 사용하였다.

실시에 24

체중이 18-22g 되는 암컷 OBA/2마우스 여리마리를 6-10마리씩 한 무리로 해서 6-10무리로 한 것을 RPMT 1640 0.5ml 중에 혼탁시킨 1.5×10^6 의 L1210 종양세포를 복강내 주사하여 접종시켰다. 복수의 계열유통 또는 동결된(액체 질소) 배양물로 L1210 세로계통을 유지하였다. 치료를 하지 않았는데도 7-8일 사이에 마우스에는 2-5g의 복수종양이 생겼다. 실시에 22에 따라 제조된 리포점을 사용하여 종양을 주사한 지 1일후 치료를 시작하였는데 꼬리의 정맥내로 투여하였다. 독소루비신 5mg/kg으로 하여 유리 또는 리포좀 독소루비신으로 동물을 치료하였다. 대조군에 대해서는 리포좀 독소루비신의 최고 투여량으로 주어진 것과 동일한 지질용량으로 하여 멀균식염수나 독소루비신이 없는 리포좀으로 처리했다. 종양을 주사하기 전에 마우스의 체중을 달고 한 무리내에서 먼저 죽는 것이 생길때까지 매일 체중을 기록하였다. 생존시간을 종양주사후의 결과일수로 기록하였다. 나타난 결과의 평균 및 중간 생존시간과 통계학적인 의미를 공지방법(two-tailed Wilcoxon's ranking test: randomized two-group design)으로 판단하였다.

유리독소루비신과 리포좀-독소루비신을 10, 20, 30 및 40mg/kg 사용하여 위의 방법을 반복하였다.

실시에 25

실시에 2의 방법에 따라 리포좀을 만들었다. P388 백혈병 모델을 사용할 경우에는 종양세포(1×10^5 cells in 0.1ml)를 암컷 CDF-1 마우스에 복강내로 주사하였다. 종양접종한지 하루후에 리포좀 독소루비신(5mg/kg의 용량)을 마우스의 꼬리정맥을 통해 주사하였다. 각 무리의 평균체중에 따라 투약량을 계산하였고 0일째 되는 날(종양 주사한 날)과 5일째 되는 날에 체중을 측정하였다. 사망율을 1일 기준으로 기록하였다.

투여량을 10mg/kg과 20mg/kg으로 하여 위의 방법을 반복하였다.

독소루비신이 없는 리포좀 염수용액 또는 독소루비신을 마우스의 꼬리에 주사하여 위의 방법으로 실시하였다.

실시에 26

EPC/콜레스테롤(몰비 55:45)를 사용하여 실시에 2의 방법에 따라 리포좀을 만들었다. 약물의 98%이상이 리

포종에 험입되었다.

앞서 접종시킨 마우스의 1차 종양으로부터 얻은 1×10^5 개의 SC-115 세포를 수컷 마우스(shinogi mice: 체중 25-40g; 무리당 9마리) 어미마리에다 피하주사를 하였다. 측진(觸診)으로 종양성장을 알아보고 버어니어 켈리퍼(vernier caliper)를 사용하여 종양을 측정하였다. 종양이 0.5-2.0g까지 성장했을 때 (총약종량=[폭×길이 1/2, 측정단위mm] 7일 간격으로 (지시된 용량의 3회 주사) 리포좀 독소루비신을 13mg/kg의 투약량으로 해서 마우스에 투여했다. 1차 처리후 1주 3회, 50일동안 종양성장을 모니터링하던지 종양중량이 9g을 초과하는때 동물을 죽여 종양성장을 모니터링 하였다. 치료투약량은 종양을 접종하기 전의 동물의 최초 중량에 따랐다.

위의 방법을 반복하고 마우스에다 독소루비신이 없는 리포좀 염수를 투여했다(리포좀 독소루비신의 용량이 13mg/kg인 경우에서와 동등한 용량을 투여).

유리상태 독소루비신과 리포좀 독소루비신을 3.25mg/kg 및 6.5mg/kg의 용량으로 하여 위의 방법을 반복하였다.

그 결과를 보면 투약량은 유리독소루비신과 리포좀 독소루비신에 의해 유발되는 종양성장 억제와 관계가 있음을 알 수 있다.

실시예27

300mM 시트르산 완충액(pH 4.0) 중에서 소용돌이식으로 혼합하면서 DSPC/콜레스테롤(몰비 55:45)의 필름을 수화처리함으로써 리포좀을 제조하였다. 이를 MLV(총질 100mg/완충액 2ml)를 60°C로 가열된 열자켓 LUVET에서 기공크기가 200nm인 폴리카보네이트 필터에서 10회 압출하였다. 1mg/ml의 빙크리스틴솔페이트(Oncovin, Eli Lilly and Co., Indianapolis, IN)의 용액에다 리포좀을 가하여 약물 대 총질의 중량비가 약 0.17:1이 되게 하였다. 여기에다 충분한 량의 1.0M Na₂HPO₄를 가하여 pH가 약 7.0되게 하였다. 이 시료를 60°C에서 10분 가열하여 리포좀 내부에다 약물을 98%이상의 함입효율로 캡슐화 하였다.

EPC/콜레스테롤과 HSPC/콜레스테롤을 사용하여 위의 방법을 반복하였다.

20mM HEPES, 150mM NaCl(pH 7.5)에서의 투석조건하에서 21°C와 37°C에서 약물 유지량을 측정했다. 표1은 여러가지 빙크리스틴을 사용하여, 특히 시그마사[Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO)와 Oncovin, Eli Lilly Co. (Indianapolis, IN)]의 것들을 사용하여 EPC/콜레스테롤, HSPC/콜레스테롤 및 DSPC/콜레스테롤 소포의 빙크리스틴 흡수특성을 나타낸 것이다.

투석결과를 보면 HSPC/콜레스테롤과 DSPC/콜레스테롤 리포좀들은 빙크리스틴의 캡슐화가 10%이하임을 알 수 있다.

실시예 28

암컷 DBA/2J 마우스(체중 18-22g, 1무리당 10마리)의 꼬리정맥을 통해 리포좀에 캡슐화된 빙크리스틴 0.2ml를 주사하여 30일후의 사망률과 평균체중을 조사함으로써 투약량 응답 생존연구를 하였다.

L1210 림프구성 백혈병 모델을 사용하여 유리 빙크리스틴과 리포좀 빙크리스틴의 항종양 활성을 평가하였다. 앞서 감염시킨 마우스의 복수에서 얻은 1×10^6 의 L1210 세포를 DBA/2J 마우스(1무리당 6마리)에게 복강내 주사를 하였다. 실시에 27에 따라 제조한 리포좀 빙크리스틴을 종양접종후 여러가지 시간에 정맥내투여를 하고 체중과 사망률을 조사하였다.

유리 빙크리스틴과 아무것도 함유되지 않은 리포좀을 투여하여 위의 방법을 반복하였다.

실시예 29

자질농도 100mg/ml에서 300mM 탄산나트륨(pH 9.6:10% H₂SO₄로 조정)중에서 필터(0.2 μm Nucleopore polycarbonate straight through path filter 2개) 속으로 60°C에서 10회 압출함으로써 DSPC/콜레스테롤 소포(55:45)를 제조하였다. 외부 왼충액을 재거하고 150mM K₂SO₄, 20mM HEPES(pH 7.4 : NaOH로 조정)로 평형된 G-50 Sephadex 칼럼속으로 소포를 통과시켜 pH기울기를 설정했다. 이를 소포를 21°C에서 60분간 2mM 5-풀루오로 우라실(FU)(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)로 혼온처리하였고, 혼온처리온도를 60°C로 올려서 60분간 유지하였다. 함입되지 아니한 FU를 외부완충액과 평형화된 G-50 칼럼속을 통과시켜 재거하였다.

제7도는 온도의 함수로 나타낸 FU흡수 그래프이다. 60°C에서 리포좀을 혼온처리한 결과 FU흡수가 크게 개선되었다. 제7도에서 Δ_r는 온도가 21°C에서 60°C로 증가한 온도증가분이다.

FU를 함유한 위의 리포좀을 37°C에서 150mM NaCl로 평형화된 Sephadex G-50 칼럼속에 통과시켰다. pH 기울기에 따라 5-FU를 재차 평형화시켰다(제8도). 제8도는 외부원충액이 37°C에서의 FU 방출에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다.

최초의 K₂SO₄ 원충액을 함유하는 리포좀을 250mM 암모늄 아세테이트의 경우로 대체하기도 하였다. FU가 완전히 방출되었다(제8도).

실시예 30

난 포스파티딜콜린(15mg)을 300mM 시트르산(pH 4.0) 2ml에 분산시키고 여기서 얻은 MLV를 액체 질소중에서 동결시켰다가 운수(약 35°C)에 해동시켰는데 이러한 사이클을 모두 5회 반복하였다. LUVET 방법을 사용하여 기공크기가 100nm인 두 개의 2층 폴리카보네이트 필터속으로 지질을 10회 압출하였다. 300mM NaCl, 20mM HEPES(pH 7.5)로 사전 평형화된 Sephadex G-50 칼럼(1.5cm × 10cm)속으로 소포를 통과시켜 양성자 기울기를 만들었다. 칼럼에서 용리된 대형 단일층 소포의 일부를 취하여 300mM NaCl, 200mM HEPES(pH 7.5)중에서 희석함으로써 전체체적 2ml에 대해 지질농도가 0.75mg/ml되게 한 다음 증류수에 가한 모액

(5.64mg/ml)으로부터 다우노루비신(113μg)을 첨가했다. 이 혼합물을 실온(25°C)에서 항온처리하고, 2, 10, 20, 30, 60 및 120분의 간격으로 100μl 분취액을 1ml 미니칼럼(Sephadex G-50)을 통해 원심분리하여 소포로부터 캡슐화되지 아니한 다우노루비신을 제거하였다. 힘입된 다우노루비신의 농도를 소포를 1% Triton X-100에 용해한 후 Shimadzu UV-265 분광분석기에서 500nm에서의 흡광도로부터 측정하였다. ³H-DPPC의 트레이서레벨을 사용하여 액체 섬광계수기에서 자질을 정량했다. 약물 대 자질의 몰비가 1:5인 소포에 의하여 다우노루비신 98%이상의 캡슐화 되었다.

실시예 31

모액(5.6mg/ml)으로부터 얻은 소포 혼탁액(2ml)에다 애피루비신(116μg)을 첨가하는 외에는 실시예 30의 물질과 방법을 사용하였다. 소포를 1% Triton X-100에 용해시킨 후 500nm에서의 흡광도로부터 애피루비신 흡수량을 정량하였다. 소포에 의한 애피루비신의 캡슐화는 약물 대 자질의 몰비가 1:5인 것으로 98%이상으로 나타났다.

실시예 32

모액(2mg/ml)으로부터 얻은 소포 혼탁액(2ml)에다 미토크산트론(103μg)을 첨가한 것외에는 실시예 30의 물질과 방법을 사용했다. 소포를 2% Triton X-100에 용해한 후 670nm에서의 흡광도로부터 미토크산트론 흡수량을 정량하였다. 소포에 의한 미토크산트론의 캡슐화는 98%이상으로서 약물 대 자질의 몰비가 1:5이었다.

실시예 33

시스플라핀(200μM)을 리포좀 혼탁액과 혼합한 것외에는 실시예 30의 물질과 방법을 사용하였다. 막투과 pH 기울기에 의해서도 시스플라빈은 리포좀 속에 축적되지 않았다.

[표 1]

각종 리포좀 벤크리스팅 계제의 험입효율

제료	온도 (°C)	벤크리스팅 공급처	약물:자질 (wt:wt)	험입효율
EPC/글래스테올	60	SIGMA사	0.24:1	95.0
EPC/글래스테올	60	ONCOVIN사	0.29:1	88.0
HSPC/글래스테올	21	SIGMA사	0.20:1	16.0
HSPC/글래스테올	60	SIGMA사	0.20:1	100.0
DSPC/글래스테올	60	ONCOVIN사	0.24:1	100.0

(57) 청구의 범위

청구항 1

(가) 최소한 한가지의 안트라시이클린류 항종양제와 시트레이트, 속시네이트와 옥살레이트 용액에서 선택된 내부 수용성 완충액과 최소한 한가지의 자질로 구성된 리포좀 이때, 항종양제:자질비는 0.01:1 내지 3:1이고, (나) 리포좀 외부에 염기성 수용액으로 구성되고 이때 리포좀은 막투과 pH농도차를 가지는 것을 특징으로 하는 리포좀 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 안트라사이클린이 독소루비신, 다우노루비신 또는 애피루비신인 리포좀 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 리포좀 내부 수용성 완충액은 시트레이트 완충액이고 리포좀 외부 수용성 완충액은 탄산나트륨 또는 비스인산나트륨으로 구성되는 것을 특징으로 하는 리포좀 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 지질은 디스테아로일 포스파티딜콜린, 수소 첨가 대두 포스파티딜콜린, 디팔미토일 포스파티딜콜린, 디미리스토일 포스파티딜콜린 또는 디아라키도노일 포스파티딜콜린인에서 선택된 인지질로 구성된 것을 특징으로 하는 리포좀 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 지질이 콜레스테롤인 리포좀 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 인지질이 콜레스테롤인 경우 몰비가 약 55:45인 리포좀 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 리포좀이 대형 단층라엘라 리포좀인 것을 특징으로 하는 리포좀 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 리포좀의 직경이 약 100㎚-약 30㎚인 리포좀 조성물.

청구항 9

제7항에 있어서, 리포좀이 크기 분포에 있어서 균일한 리포좀 조성물.

청구항 10

제1항에 있어서, 지질농도가 약 90-약 100mg/ml 리포좀 조성물.

청구항 11

제1항의 리포좀 조성물과 약제학적으로 허용되는 담체나 화석제로 되는 약제학적 조성물.

청구항 12

제1항에 있어서, 리포좀 조성물이 탈수된 것인 리포좀 조성물.

청구항 13

제1항에 있어서, 지질로는 난 포스파티딜콜린, 난 포스파티딜 글리세롤, 디스테아로일 포스파티딜콜린, 수소 첨가 대두 포스파티딜콜린 또는 디팔미토일 포스파티딜콜린이 포함되고 항종양제로는 독소루비신인 포함되며 항종양제:지질의 비가 약 0.1:1이며 냉충역제용 완충액 조성물은 시트르산/탄산나트륨인 리포좀 조성물.

청구항 14

제13항에 있어서, 지질에 추가로 콜레스테롤이 포함되는 리포좀 조성물.

청구항 15

제1항에 있어서, 지질로는 난 포스파티딜콜린이 포함되고, 항종양제로는 다우노루비신, 에피루비신 또는 미토크산트론이 포함되며, 항종양제:지질의 비가 약 0.01:1-약 3.0:1이며 냉출 억제용 완충액이 시트르산/탄산나트륨인 리포좀 조성물.

청구항 16

가) 시트레이트, 옥실레이트와 속시네이트 용액에서 선택된 내부 완충액을 포함하는 리포좀으로 구성된 제1수용액; 나) 염기성 수용액; 그리고, 다) 적어도 하나의 안트라사이클린류으로 구성된 3성분개에 있어서, 이때 상기 가), 나) 그리고 다)의 성분을 혼합하여 제1항에 따른 리포좀을 만드는 것을 특징으로 하는 리포좀-항종양제.

청구항 17

제16항에 있어서, 안트라사이클린 항종양제는 다우노루비신 또는 독소루비신인 것을 특징으로 하는 리포좀-항종양제.

청구항 18

제17항에 있어서, 시트르산 완충액 pH가 약 3.5-약 4.5인 리포좀-항종양제.

청구항 19

제18항에 있어서, 시트르산 완충액의 pH가 약 4.0인 리포좀-항종양제.

청구항 20

제16항에 있어서, 1차 수용액이 시트르산 완충액인 것을 특징으로 하는 리포좀-항종양제.

청구항 21

제16항에 있어서, 리포좀을 탈수하여서 되는 리포좀-항종양제.

청구항 22

제16항에 있어서, 협입 지시용액으로 된 제4성분을 추가로 포함하는 리포좀-항종양제.

청구항 23

인지질의 2중층 막을 가지며 인지질이 필수적으로 디스테아로일 포스파티딜콜린, 디팔미토일 포스파티딜콜린, 디미리스토일 포스파티딜콜린으로 되어 있는 대형 단일층 소포.

청구항 24

제23항에 있어서, 추가로 콜레스테롤을 포함하는 대형 단일층 소포.

청구항 25

제24항에 있어서, 인지질과 콜레스테롤의 몰비가 55:45인 소포.

청구항 26

제23항 또는 제25항에 있어서, 소포의 직경이 약 60-약 300mm인 대형 단일층 소포.

청구항 27

제23항에 있어서, 생체활성제를 추가로 포함하는 대형 단일층 소포.

청구항 28

제27항에 있어서, 생체활성제가 항종양제인 대형 단일층 소포.

청구항 29

제1항에 있어서, 항종양제와 지질과의 비율이 약 0.1:1-약 3:1이 되는 것을 특징으로 하는 리포좀 조성물.

청구항 30

제29항에 있어서, 항종양제와 지질과의 비율이 약 0.3:1-약 3:1이 되는 것을 특징으로 하는 리포좀 조성물.

청구항 31

제1항에 있어서, 항종양제가 적어도 50%내지 100%가 리포좀내에 포획되어 있는 것을 특징으로 하는 리포좀 조성물.

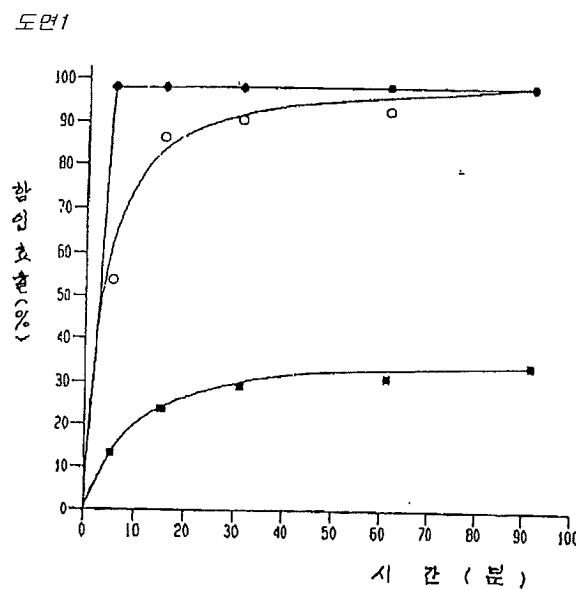
청구항 32

리포좀내에 이온화된 항종양제를 적하하는 방법에 있어서, 항종양제가 적하될 리포좀의 막을 가로지르는 방향으로 화학적 전위차를 가지는 리포좀을 만들고 리포좀의 외부에 있는 배지에 항종양제를 첨가하는 것으로 구성된 것을 특징으로 하는 리포좀 조성물.

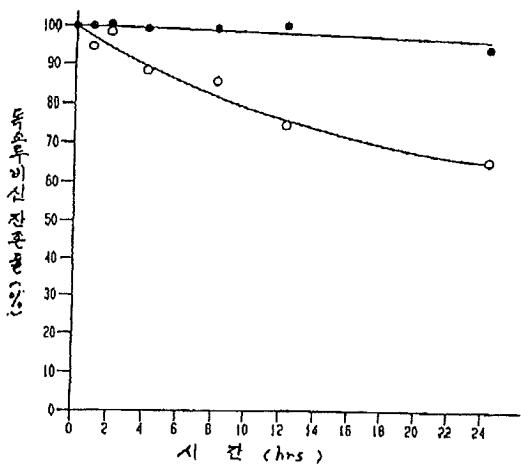
청구항 33

제32항에 있어서, 화학적 전위차는 방출의제용 완충액 조합물에 의해 생성되는 것을 특징으로 하는 리포좀 조성물.

도면1



도면2



도면3

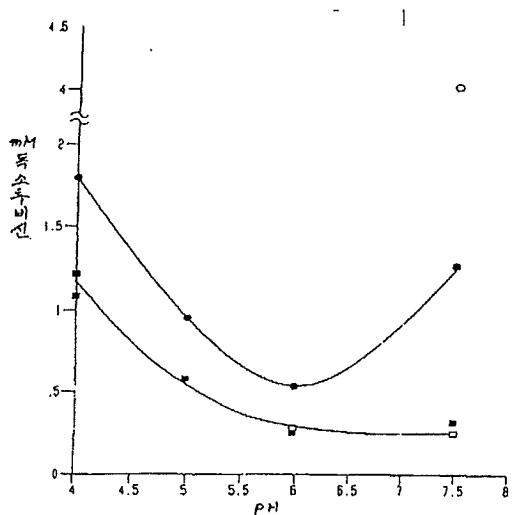


도표4

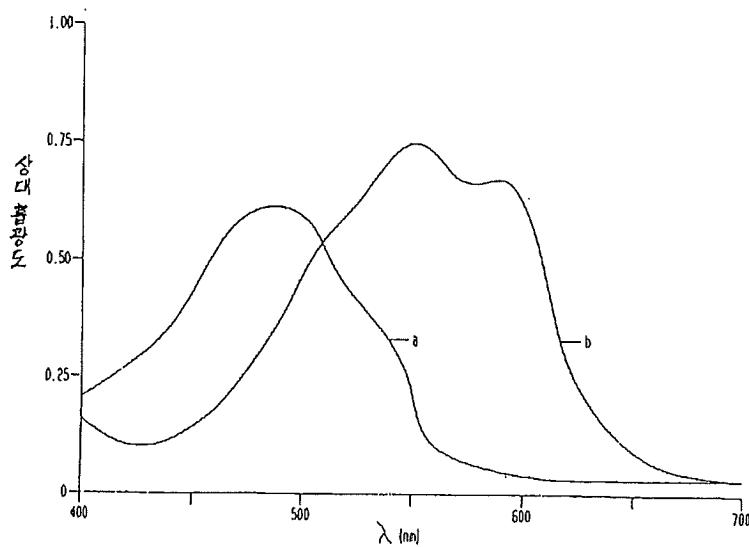


도표5

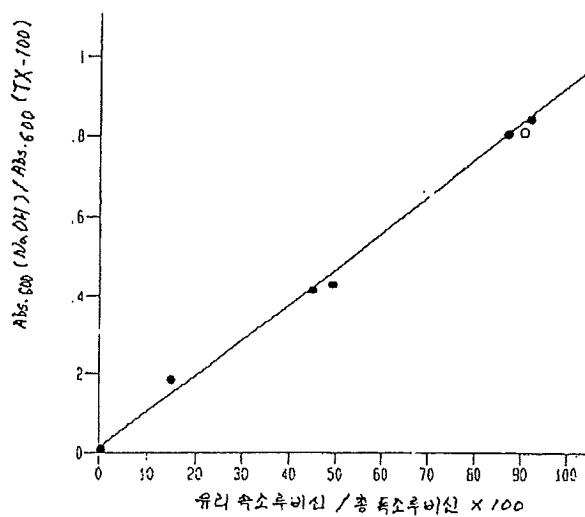


도표6

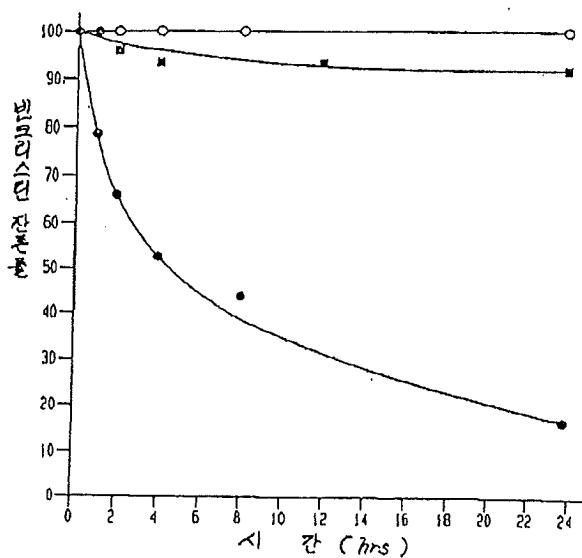
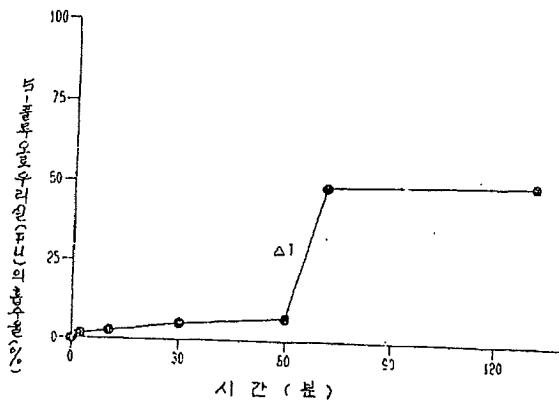
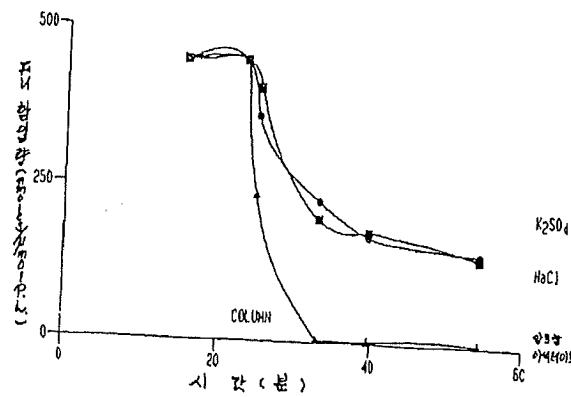


도표7



도면 8



21-21